



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Einfluss von Fraktionen aus Weinlaub und  
Traubenmaterial auf die endotheliale NO-Synthase“

Verfasserin

Sandra Kastner

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt.  
Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt.  
Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuer:

ao. Univ. Prof. Dr. Gottfried Reznicek



# **DANKSAGUNG**

Diese Diplomarbeit widme ich meinen Eltern, die mir während meines Studiums tatkräftig zur Seite gestanden sind und mich immer unterstützt haben. Ohne sie wäre dies nicht möglich gewesen.

Ein herzliches Dankeschön an Herrn ao. Univ. Prof. Dr. Gottfried Reznicek und Mag. Oliver Donath für die Betreuung. Es war eine sehr lehrreiche und schöne Zeit.

Weiters möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Departments für Pharmakognosie bedanken.

Ich danke all meinen Freunden, besonders Alexandra und Michael, die immer für mich da waren und mir den Rücken gestärkt haben.



# INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG.....	1
2 MATERIAL UND METHODEN .....	6
2.1 Probenmaterial .....	6
2.1.1 Traubenbestandteile .....	6
2.1.2 Weinlaub .....	6
2.2 Extraktion und Fraktionierung.....	7
2.2.1 Fraktionierte Extraktion der Traubenbestandteile .....	7
2.2.2 Auftrennung der Extrakte in polare und apolare Phasen.....	9
2.3 Chromatographische und spektrometrische Methoden .....	10
2.3.1 Dünnschichtchromatographie .....	10
2.3.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	12
2.3.3 Gelchromatographie.....	15
2.3.4 Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS).....	15
2.4 Arginin-Citrullin-Konversions-Assay (ACCA) .....	18
2.5 Western Blot auf eNOS .....	19
3 EXPERIMENTELLER TEIL .....	22
3.1 Analyse der Traubenbestandteile .....	23
3.1.1 Fraktionierte Extraktion der Traubenbestandteile .....	23
3.1.2 Bioassay-Ergebnisse der MeOH- und DCM-Fraktionen.....	24
3.1.3 Analyse der EA- und H <sub>2</sub> O-Fraktionen .....	26
3.1.3.1 Dünnschichtchromatographische Analyse der EA- und H <sub>2</sub> O- Fraktionen .....	28
3.1.3.2 HPLC-Vergleiche der EA- und H <sub>2</sub> O-Fraktionen .....	29
3.1.3.3 ACCA-Ergebnisse der EA- und H <sub>2</sub> O-Fraktionen.....	34
3.1.3.4 Western Blot Ergebnisse der EA- und H <sub>2</sub> O-Fraktionen .....	35
3.1.4 Analyse der SCH-MeOH-Subfraktionen.....	37
3.1.4.1 Dünnschichtchromatographischer Vergleich der Subfraktionen .....	39
3.1.4.2 ACCA-Ergebnisse der Subfraktionen .....	40
3.2 Analyse des Weinlaubs .....	41
3.2.1 Fraktionierte Extraktion des grünen und roten Weinlaubs.....	41

3.2.2 Bioassay-Ergebnisse der MeOH- und DCM-Extrakte .....	41
3.2.3 Analyse der EA- und H <sub>2</sub> O-Fraktionen .....	42
3.2.3.1 Dünnschichtchromatographische Vergleiche der Fraktionen .....	42
3.2.3.2 HPLC-Vergleiche der Fraktionen .....	44
3.2.3.3 Bioassay-Ergebnisse .....	48
3.2.3.4 Western Blot-Ergebnisse.....	49
3.2.3.5. LC-MS Analyse .....	50
3.2.4 Analyse der RWL-Ethylacetat-Subfraktionen.....	56
3.2.4.1 Dünnschichtchromatographische Charakterisierung der Subfraktionen .....	58
3.2.4.2 Gegenüberstellung DC mit HPLC in Hinblick auf HPLC-Vergleiche der RWL-EA-Subfraktionen .....	60
3.2.4.3 Bioassay-Ergebnisse .....	62
3.2.4.4 Western Blot.....	64
 4 DISKUSSION.....	 66
 5 ZUSAMMENFASSUNG .....	 70
 6 LITERATURVERZEICHNIS .....	 74
 7 LEBENS LAUF .....	 75

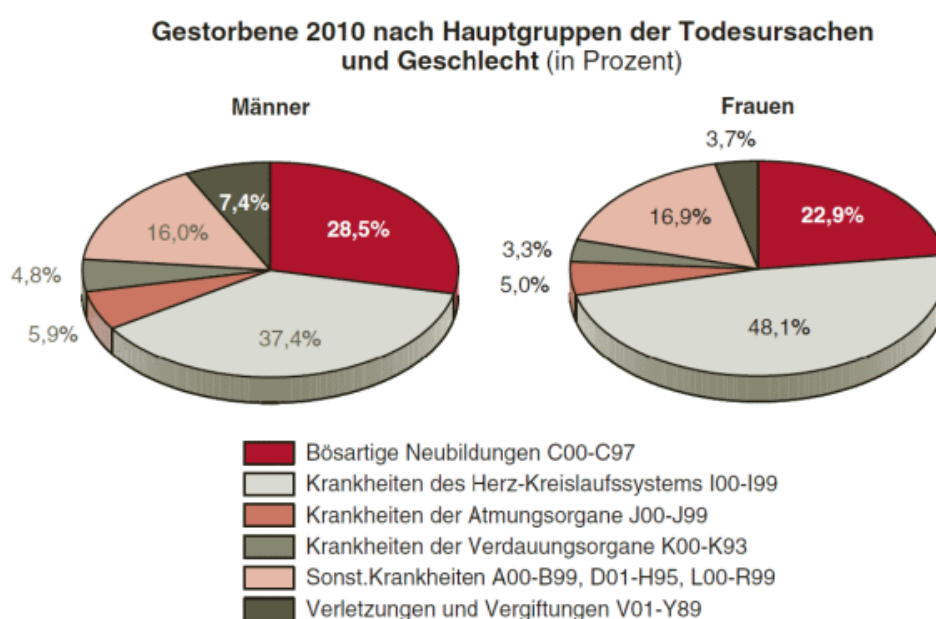






# 1 EINLEITUNG

Nach wie vor zählen Herz-Kreislauf-Erkrankungen und deren Folgeerkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in Österreich, sowie auch in anderen Industrieländern<sup>1</sup>. Im Jahre 2010 war in Österreich der größte prozentuelle Anteil der Todesfälle durch Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems entstanden. Anhand der Abbildung (Abb. 1<sup>2</sup>) wird ersichtlich, dass es sich dabei geschlechtsunspezifisch um die häufigste Todesursache handelt, zusätzlich traten 10% mehr Todesfälle bei Frauen auf.



Q: STATISTIK AUSTRIA, Todesursachenstatistik. Erstellt am: 11.06.2011.

**Abb. 1: Todesursachenstatistik nach Geschlecht in Österreich im Jahr 2010<sup>2</sup>**

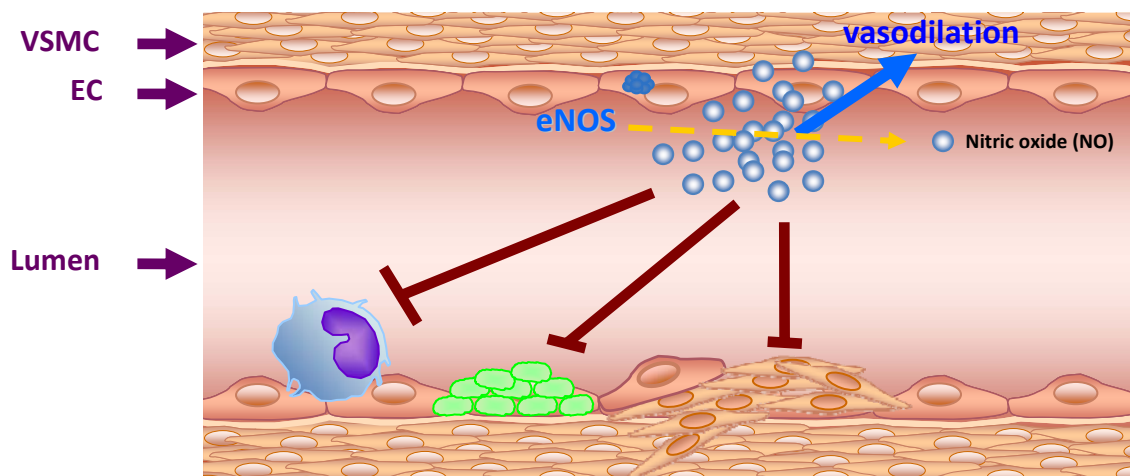
Eine wesentliche Rolle spielen vor allem Risikofaktoren wie Rauchen, Hypertonie, Stress, Hyperlipidämie und Fehlernährung, da ein erhöhter Konsum an gesättigten Fettsäuren und Cholesterin das Arteriosklerose-Risiko und somit auch die Mortalität durch kardiovaskuläre Erkrankungen steigert. Bezugnehmend auf diese Umstände und umfassende epidemiologische Studien (Renaud, Lorigeril) hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass ein moderater und regelmäßiger

<sup>1</sup> Räthel T.R. (2005)

<sup>2</sup>[http://www.statistik.at/web\\_de/statistiken/gesundheit/todesursachen/todesursachen\\_ausgewaehlte/024439.html](http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/todesursachen/todesursachen_ausgewaehlte/024439.html), 20.06.2011

Rotweinkonsum mit einer sinkenden Sterberate hinsichtlich kardiovaskulärer Erkrankungen korreliert werden kann. Bezeichnet wird dieser Effekt als Französisches Paradoxon. Hierbei handelt es sich um das Phänomen, dass in Frankreich trotz fettreicher Ernährung das Risiko an Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu sterben geringer als in anderen europäischen Ländern ist<sup>3</sup>. Zurückzuführen ist dieser Effekt auf die im Rotwein enthaltenen Polyphenole, die eine positive Wirkung auf das Gefäßsystem, und im speziellen auf die Endothelfunktion ausüben.

Eine funktionierende Endothelschicht ist erforderlich für gesunde Gefäße. Sie kleidet die Innenseite der Blutgefäße aus, setzt vasoaktive Substanzen (Stickstoffmonoxid, PGI<sub>2</sub>, u.a.) frei und stellt eine Art Gewebe-Blut-Barriere dar<sup>4</sup>. Stickstoffmonoxid (NO) zählt zu den wichtigsten Mediatoren, die für die Vasodilatation durch das Endothel verantwortlich sind. NO wird als Antwort auf bestimmte Reize, wie erhöhte Scherkräfte auf das Gefäß, durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) oxidativ aus L-Arginin synthetisiert. Zusätzlich entsteht äquimolares L-Citrullin als Nebenprodukt (s. Abb. 2). Die kardioprotektive Wirkung des NO ist neben dem vasodilatierenden Effekt durch die Hemmung der Thrombozytenaggregation, sowie der Adhäsion von Leukozyten und antiproliferierende Eigenschaften charakterisiert (s. Abb. 2).



**Abb. 2: Synthese und Wirkungen des Stickstoffmonoxids (NO)**

<sup>3</sup> Renaud S., Lorgèril M. (1992)

<sup>4</sup> Aktories, Förstermann, et al. (2005)

Spricht man von einer endothelialen Dysfunktion, so steht nicht mehr genügend NO zur Aufrechterhaltung der Gefäßhomöostase zur Verfügung. Das Gleichgewicht ist somit gestört und es kommt zu einer verstärkten Vasokonstriktion, zur Blutplättchenadhäsion, zu Wachstum und Migration von Gefäßzellen und folglich zu Entzündungen, Thrombose und Arteriosklerose<sup>5</sup>. NO kann somit ein protektiver Effekt auf die Gefäße zugeschrieben werden.

Anhand einer Reihe von in-vivo und in-vitro Studien hat sich gezeigt, dass die polyphenolischen Inhaltsstoffe des Rotweins wichtige kardiovaskuläre Wirkungen aufweisen. Dazu zählt die erhöhte Proteinexpression der eNOS, die vermehrt NO bildet und dadurch wirkt es einer endothelialen Dysfunktion entgegen. Zu den Polyphenolen zählen Mono-, Oligomere der Catechingerbstoffe, Anthocyane, Flavonoide und Gallensäuren-Derivate, sowie das bereits intensiv untersuchte Resveratrol, das der Stoffgruppe der Stilbenderivate zuzuordnen ist<sup>6</sup>.

Aufgrund der unterschiedlichen Vinifikation enthält der Weißwein einen geringeren Polyphenolgehalt und weist daher keinen Effekt auf. Der ausgepresste Saft der weißen Trauben wird lediglich vergoren, bei der Rotweinherstellung hingegen verbleibt die gesamte Traube in der Maische und somit gelangen die darin enthaltenen Inhaltsstoffe in den Vergärungsprozess<sup>7</sup>. Bezugnehmend auf das Herstellungsverfahren und den bereits gesicherten Effekt des Rotweins, ist zu klären, ob lediglich der Gärungsprozess für den protektiven Effekt durch die Endothelzellen verantwortlich ist, oder ob bereits der Traubensaft eine erhöhte Freisetzung von NO bewirkt.

In dieser Arbeit wurden einerseits weiterführende Untersuchungen einer vorangegangenen Diplomarbeit zum Weinlaub durchgeführt, und andererseits die Wirkung von Trauben und Traubenteile auf die Aktivität der endothelialen NO-Synthase an EA.hy926-Zellen, (s. Kap. 3.1.3.3, 3.1.4.2, 3.2.2) analysiert<sup>8</sup>. Aufgrund der bereits durchgeführten Bioassays wurde festgestellt, dass der

---

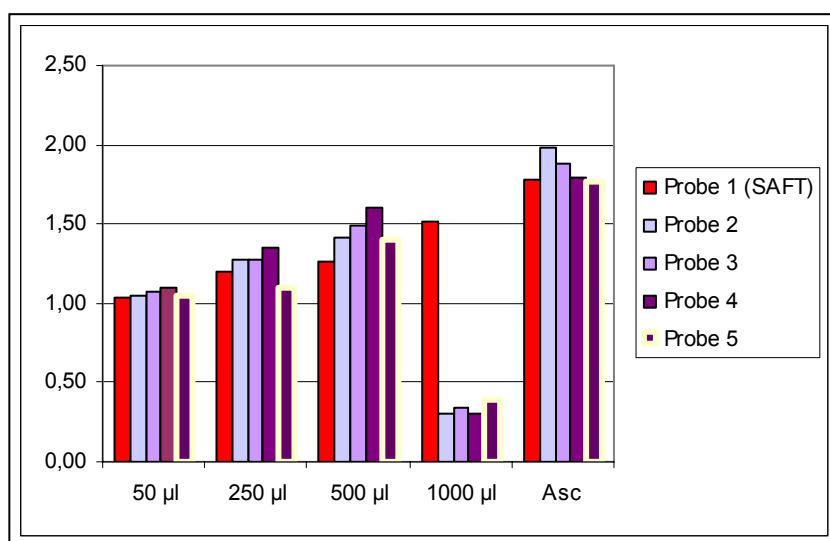
<sup>5</sup> Dirsch V., Rotwein – Prävention mit Genuss?

<sup>6</sup> Leikert et al (2002)

<sup>7</sup> Dirsch V.; Rotwein – Prävention mit Genuss?

<sup>8</sup> Hager E.

Gärungsprozess nicht allein für die Wirkung des Rotweins verantwortlich ist, sondern, dass bereits der Traubensaft die Aktivität der eNOS steigert<sup>9</sup>.



**Abb. 3: Aktivität der entnommenen Proben während des Gärungsprozesses**

In Abb. 3 wird ersichtlich, dass die während des Gärungsprozesses gezogenen Proben eine unterschiedliche ansteigende und konzentrationsabhängige Aktivität aufweisen. Ab einer Konzentration von 1000µl/Well (~5ml) ist aufgrund des enthaltenen Alkohols die Funktionalität der Endothelzellen nicht mehr gegeben und daher kann bei dieser Konzentration keine Aktivität festgestellt werden. Im Gegensatz dazu bleibt die Wirkung beim Traubensaft erhalten.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Inhaltsstoffe der Traubenbestandteile mittels spezieller Fraktionierungsmethoden aufzutrennen und auf ihre Aktivität im Zellassay (Arginin-Citrullin-Conversion-Assay, „ACCA“) (s. Kap. 2.4) zu untersuchen. Im weiteren Verlauf wurden chromatographische Methoden herangezogen, um die Inhaltsstoffmuster der Fraktionen zu charakterisieren und somit Vergleiche der unterschiedlichen Traubenbestandteile heranzuziehen.

Im Mittelpunkt der Diplomarbeit standen jene Fraktionen, die eine Erhöhung der NO-Freisetzung bewirken und mittels ihrer Fingerprints wurde versucht, auf die aktiven Substanzen zu schließen.

<sup>9</sup> Donath O.

Anschließend sollte ein weiteres chromatographisches Verfahren, die Gelchromatographie, herangezogen werden, um die Inhaltsstoffe mittels Sephadex nach ihrer Molekülgröße aufzutrennen. Die entstandenen Subfraktionen sollten wiederum auf ihre eNOS-Aktivität untersucht und mit Hilfe der HPLC qualitativ verglichen werden.

Für weitere Analysen der aktiven Fraktionen und Subfraktionen sollte der Western Blot (s. Kap. 2.5) eingesetzt werden. Western Blotting dient zur Überprüfung der Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase und steht im engen Zusammenhang mit dem ACCA. Bewirkt eine Fraktion einen positiven Effekt auf die Proteinexpression und somit eine gesteigerte Bildung der eNOS, so kann im Arginin-Citrullin-Conversion-Assay eine erhöhte Aktivität der Synthase gezeigt werden.

Neben den Traubenbestandteilen sollte auch Rotes und Grünes Weinlaub (s. Kap. 2.1.2) für eNOS-Aktivitäts-Untersuchungen gewählt werden, das bereits in einer vorangegangenen Diplomarbeit verwendet wurde<sup>10</sup>. Man vermutet, dass die Inhaltsstoffe der Trauben, deren protektive Wirkung angenommen wird, möglicherweise auch in anderen Teilen der Pflanzen vorliegen. Dieses Probenmaterial sollte zusätzlich mittels Flüssigkeitschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS) (s. Kap. 2.3.4) untersucht werden.

---

<sup>10</sup> Hager E.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Probenmaterial

#### 2.1.1 Traubenbestandteile

In dieser Diplomarbeit wurden Weintrauben der Sorte Blaufränkisch aus der Region Neusiedlersee (Hügelland - Rust, E. Triebaumer, 2008) für Untersuchungen in ihre Einzelteile - Kerne, Saft, Schale und Stängel - zerlegt.

<b>Traubenbestandteil</b>	<b>Abkürzung</b>
Kerne	K
Saft	SA
Schale	SCH
Stängel	ST

**Tab. 1: Abkürzungen für die Traubenbestandteile**

#### 2.1.2 Weinlaub

Weiters wurde das Weinlaub desselben Weingartens verwendet (Blaufränkisch, Hügelland – Rust, E. Triebaumer, 2008). Die roten und grünen Weinblätter weisen ausschließlich einen Unterschied im Zeitpunkt des Sammelns auf. Während das grüne Weinlaub (GWL) Ende September 2008 zum Zeitpunkt der Ernte gepflückt wurde, wurde dies erst Ende Oktober 2008 nach Rotfärbung der Blätter beim roten Weinlaub (RWL) durchgeführt. Anschließend wurden sie unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur getrocknet und konnten im Anschluss daran für Analysen herangezogen werden.



**Abb. 4 Grünes und rotes Weinlaub (Blaifränkisch, Neusiedlersee–Hügelland)<sup>11</sup>**

Weinlaub	Abkürzungen
Grünes Weinlaub	GWL
Rotes Weinlaub	RWL

**Tab. 2: Abkürzungen für das Weinlaub**

## 2.2 Extraktion und Fraktionierung

### 2.2.1 Fraktionierte Extraktion der Traubenbestandteile

Zu Beginn der praktischen Arbeit wurden zunächst Extrakte von den Traubenbestandteilen mit Hilfe der ASE 200 – Accelerated Solvent Extractor (Dionex) – hergestellt. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine beschleunigte Extraktion, die im Bezug auf andere Methoden einen Vorteil hinsichtlich des geringeren Lösungsmittelverbrauchs, Einstellung des Drucks und Temperatur, sowie eine sehr gute Reproduzierbarkeit mit sich bringt. Die Parameter für diese Methode sind in Tab. 3 ersichtlich.

<sup>11</sup> Hager E.

Heat	5 min
Static	2 min
Flush (%)	10
Purge	60
Cycles	3
Pressure (bar)	150
Temperature (°C)	40
Solvents	Dichlormethan (p.a. Qualität) Methanol (HPLC-Qualität)

**Tab. 3: Parameter der ASE (Accelerated Solvent Extractor)**

Als Vorbereitung für diese Extraktionsmethode mussten die Traubenbestandteile zunächst lyophilisiert werden, um das enthaltene Wasser zu entfernen, und anschließend wurden sie mit einer Drogenmühle (Siebgröße 0,75mm) pulverisiert. Ein aliquoter Teil der geriebenen Traubenteile wurde mit reinen (p.a. bzw. HPLC-Qualität) Lösungsmitteln extrahiert, um möglichst einheitliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Bei der vorhergegangenen Diplomarbeit<sup>12</sup> zeigten sich hohe Standardabweichungen der Extrakte des RWL und GWL in Bezug auf die induzierte NO Freisetzung, gemessen mit dem Arginin-Citrullin-Conversion Assay (s. Kaps. 2.4). Dies ist möglicherweise auf die Reinheit der Lösungsmittel zurückzuführen. Aus diesem Grunde fiel die Wahl auf Methanol (HPLC-Qualität) und Dichlormethan (p.a.).

<b>Extrakte</b>	<b>Abkürzungen</b>
Methanol-Extrakt	MeOH
Dichlormethanextrakt	DCM

**Tab. 4: Abkürzungen für die Extrakte**

---

<sup>12</sup> Hager E.



### 2.2.2 Auftrennung der Extrakte in polare und apolare Phasen

Die weitere Auftrennung der Inhaltsstoffe der MeOH-Fractionen, sowohl der Traubenbestandteile, als auch des Weinlaubs, die eine erhöhte eNOS-Aktivität bewirken (s. Kap. 3.1.2, 3.2.2), erfolgte durch das Ausschütteln mit Ethylacetat und Wasser.

In der polaren Wasserphase befanden sich möglicherweise Fruchtsäuren, Gerbstoffe, Oligomere und Phenolcarbonsäuren, wohingegen die apolare Ethylacetatphase hauptsächlich Flavonoide beinhaltete (s. Kap. 3.1.3, 3.2.3 ).

Extrakte	Abkürzungen
Wasser-Extrakt	H <sub>2</sub> O
Ethylacetat-Extrakt	EA

Tab. 5: Abkürzungen für die Extrakte

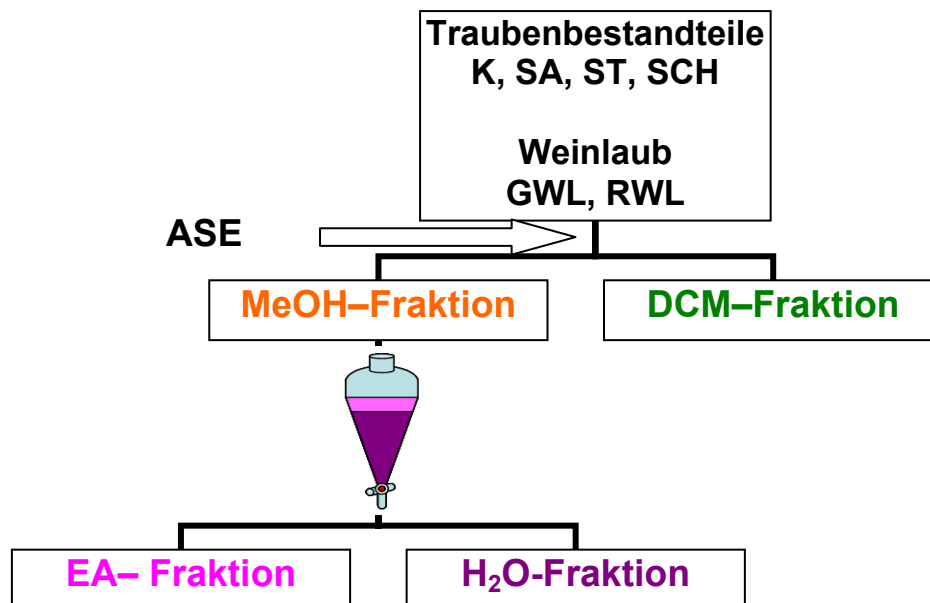


Abb. 5: Fraktionierungsschema der Traubenbestandteile und des Weinlaubs

## **2.3 Chromatographische und spektrometrische Methoden**

### **2.3.1 Dünnschichtchromatographie**

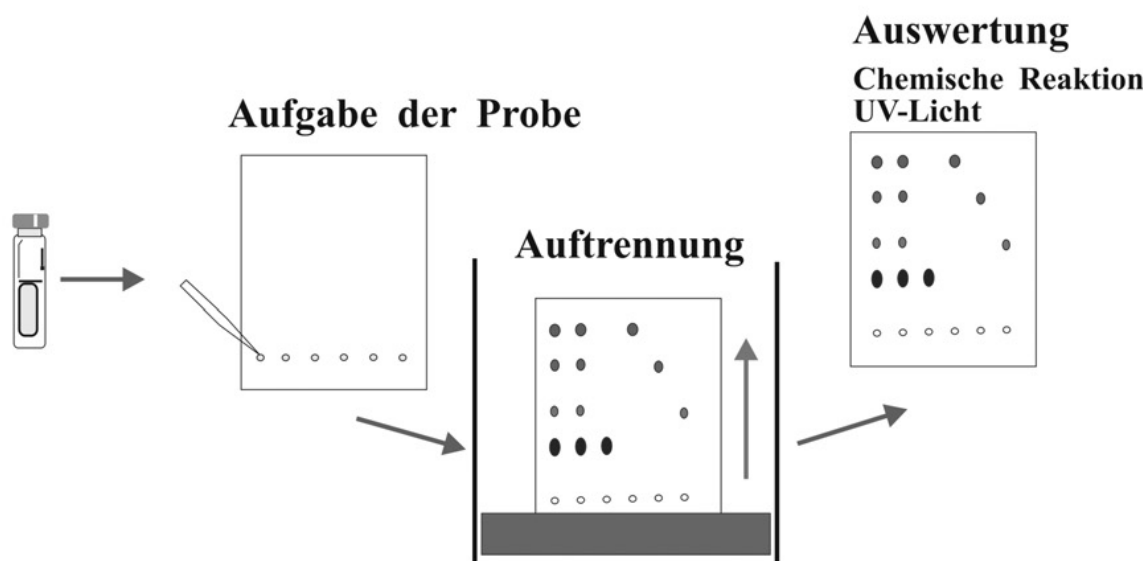
Die Dünnschichtchromatographie wurde ausschließlich für qualitative Vergleiche der Inhaltsstoffe der Fraktionen des Weinlaubs und der Traubenbestandteile genutzt.

Das Prinzip dieser Trennmethode basiert auf der unterschiedlichen Verteilung der zu untersuchenden Substanzen zwischen der mobilen und stationären Phase. Die stationäre Phase besteht aus einer stark adsorbierenden Kieselgelschicht, die z.B. auf einer Aluminiumplatte aufgetragen ist. Die zu analysierenden Fraktionen der Traubenbestandteile und des Weinlaubs werden in einem entsprechenden Lösungsmittel gelöst z.B. Methanol und mittels Mikropipette strichförmig auf die DC-Platte aufgetragen (s. Abb. 6). Nachdem das Lösungsmittel entfernt ist, wird die Platte in die mit mobiler Phase gefüllte Kammer gestellt, sodass der untere Rand vollständig in die mobile Phase eintaucht. Aufgrund der Kapillarkräfte in der stationären Phase wandert das Fließmittel aufwärts und die vorhandenen Inhaltsstoffe diffundieren entsprechend ihrer Wechselwirkungen mit der Kieselgelplatte vom Start weg zum oberen Ende der Laufstrecke<sup>13</sup>. Die verwendeten mobilen und stationären Phasen sind aus Tab. 6 zu entnehmen.

Um die Trennung der Inhaltsstoffe zu visualisieren, erfolgt die Detektion unter UV-Licht bei 366nm und 254nm bzw. nach Besprühen mit unterschiedlichen Reagentien (Tab. 7) und bei Tageslicht.

---

<sup>13</sup> Lottspeich F., Engels J.W. (2006)

Abb. 6 Prinzip der Dünnschichtchromatographie<sup>14</sup>

Stationäre Phase	HPTLC Fertigplatte Kieselgel 60 F <sub>254</sub>
Trennstrecke	8 cm
Mobile Phase	<p>„<b>CMEW</b>“ :</p> <p>Chloroform–Methanol–Eisessig–Wasser (60+12+32+8)</p> <p>„<b>111-26</b>“ :</p> <p>Ethylacetat–Ameisensäure konz.–Eisessig–Wasser (100+11+11+26)</p>

Tab. 6: Zusammensetzung der mobilen Phasen für die Dünnschichtchromatographie

<sup>14</sup> [http://www.wiley-vch.de/books/sample/3527321195\\_c01.pdf](http://www.wiley-vch.de/books/sample/3527321195_c01.pdf), Grundlagen der Chromatographie

Sprühreagenz	Zusammensetzung	Detektion	Nachweisbare Substanzklassen
Naturstoff Reagenz A (NSR-A)	1%ige Diphenylborsäure-2-aminoethylester Lösung in Methanol	UV 366 nm Farbige Fluoreszenzen	Phenole und Flavonoide
Anisaldehyd – Schwefelsäure Reagenz (AAR)	1ml Anisaldehyd + 2ml Schwefelsäure + 100 ml Eisessig	Nach dem Besprühen 10 min bei 150°C erhitzen Detektion bei Tageslicht	Unspezifische, universelle Detektion

**Tab. 7: Verwendete Sprühreagentien für die Dünnschichtchromatographie**

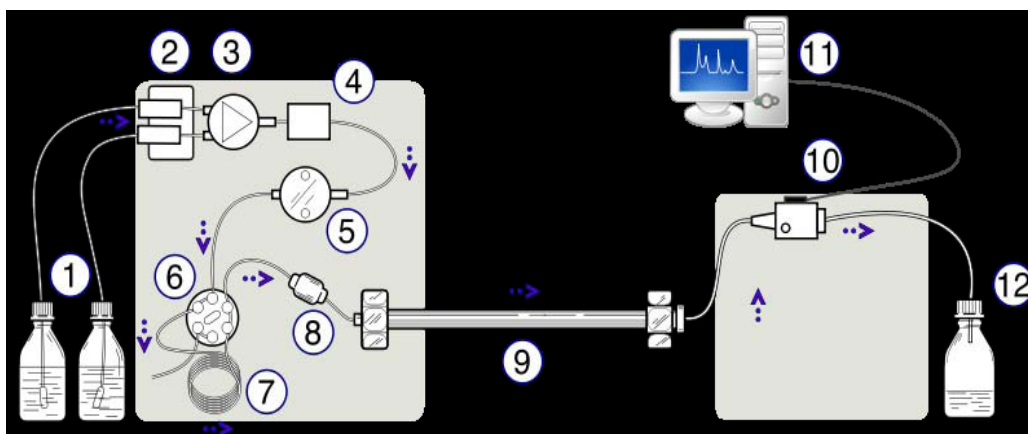
### 2.3.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die HPLC kam sowohl für qualitative und quantitative Analysen, als auch in Kopplung mit der Massenspektrometrie (LC-MS, s. Kap. 2.3.4) zur Charakterisierung des Inhaltsstoffmusters der Traubenbestandteile und des Weinlaubs zum Einsatz. Die Anwendung der HPLC erfordert u.a. eine ausreichende Löslichkeit der Fraktionen in der mobilen Phase und ist für thermolabile und nichtflüchtige Substanzen verwendbar. Das Prinzip der Trennung basiert auf der unterschiedlichen Polarität der Moleküle hinsichtlich der verwendeten stationären Phase (C-18).

Bei diesem chromatographischen Trennverfahren befindet sich die stationäre Phase in einer Stahlsäule, die von der mobilen Phase durchlaufen wird.

Die Probe wird zunächst mittels Injektionsventil in die Anlage eingespritzt und gelangt mit der mobilen Phase über die Probenschleife direkt zur Trennsäule. Eine Weiterentwicklung stellt der Autosampler dar, der die zu untersuchenden Proben automatisch injiziert und somit eine Serie von Analysen möglich macht. Um einen konstanten Eluentenfluss zu gewährleisten, ist eine Pumpe vorhanden, die die Elutionsmittel gegen einen hohen Druck transportiert. Bei diesem Verfahren wurde eine Gradientenelution durchgeführt, d.h. die Zusammensetzung von zwei Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität wird während der Chromatographie

verändert und hat somit Einfluss auf die Elutionsstärke. Bezüglich der Trennsäule handelt es sich um ein Stahlrohr, das mit Kieselgel befüllt ist. Durch chemische Modifikationen mit langen Alkylketten (C18 – s.Tab. 9) entsteht eine apolare Oberfläche. Man spricht von einer Reversed-Phase-Chromatographie. Nach der Trennung erfolgt die Detektion mit Hilfe des Diodenarray bzw. mit dem Lichtstreuendetektor (s.Tab. 9) und wird schließlich am Computer ausgewertet (s. Abb. 7<sup>15</sup>).



**Abb. 7: Aufbau einer HPLC<sup>15</sup>:** 1) Eluentenvorratsgefäße, 2) Entgaser, 3) Mischventil, 4) Mischkammer, 5) Pumpe, 6) Probeninjektor, 7) Probenschleife, 8) Vorsäule, 9) Trennsäule, 10) Detektor, 11) Computer zur Datenerfassung, 12) Abfallgefäß

Die Gerätekonfiguration und Parameter der HPLC werden in Tab.8 und Tab.9 erläutert.

Gerätekonfiguration : HPLC

Pumpe	Shimadzu LC – 20 AD
Autosampler	Shimadzu SIL – 10 AD
Detektion	Diode Array Detektor : Shimadzu SPP – M20A bei 280 nm, 366 nm und 520 nm Lichtstreuendetektor : Shimadzu ELSD – LT
Software	LC – Solution Version 1.21SP1

**Tab. 8: Gerätekonfiguration der HPLC**

<sup>15</sup>[http://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm/2004/Schmid/AnalytischeChemie\\_Skript\\_3\\_LC.pdf](http://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm/2004/Schmid/AnalytischeChemie_Skript_3_LC.pdf)

Säule	Thermo Fisher Scientific Aquasil C18 (3µm) Säulendurchmesser 2,1mm, Länge 150 mm
Temperatur	30°C
Mobile Phase	Laufmittel A : Essigsäures Wasser (pH 2,60) Laufmittel B : Acetonitril
Flussrate	0,35 ml/min
Laufzeit	70 min
Einspritzvolumen	10µl einer 1%iger Lösung
Gradient	Steigerung von Laufmittel B von 4% → 11% in 28min 11% → 31% in 20min 31% → 47% in 4min 47% → 100% in 2min 100% für 4min 100% → 4% in 1min 4% für 11min

**Tab. 9: Parameter der HPLC**

Im Gegensatz zu anderen Methoden war mit Hilfe des Lichtstreuendetektors eine semiquantitative Zuordnung der Peaks möglich, indem die Peakflächen der Chromatogramme miteinander verglichen wurden und somit die relevanten Mengen an eluierten Substanzen messbar waren. Voraussetzung dafür war ein genau definiertes Einspritzvolumen (10µl einer 1%igen Lösung). Die Detektion wurde weiters mit dem Diode Array Detektor bei 280nm, 366nm und 520nm durchführt.

Die Chromatogramme der verschiedenen Fraktionen sind im experimentellen Teil (s. Kap. 3.1.3.2, 3.2.3.2, 3.2.4.2) zu finden.

### 2.3.3 Gelchromatographie

Zur weiteren Auftrennung der aktiven Fraktionen (SCH-MeOH, RWL-EA) fiel die Wahl auf die Gelchromatographie, wodurch die vorliegenden Fraktionen nach ihrer Molekülgröße getrennt wurden.

Als stationäre Phase diente „Lipophilic Sephadex LH20“, ein inert polymeres Material (Cyclodextrin) mit genau definierter Porengröße, wodurch die Molekülgröße der Inhaltsstoffe den wichtigsten Trennfaktor bei dieser Methode darstellt. Je größer ein Molekül ist, desto schneller durchläuft es die Säule, da es nicht in den Poren retentiert werden kann.

Die erhaltenen Subfraktionen wurden mit Hilfe der HPLC und DC im Vergleich zu der Ausgangsfraction untersucht, um die Trennung der Inhaltsstoffe ersichtlich zu machen.

Stationäre Phase	Lipophilic Sephadex LH20
Eluens	Methanol
Säulenhöhe	80cm
Durchmesser	2,0cm
Volumen	314cm <sup>2</sup>

Tab.10: Parameter für die Säulenchromatographie mit „Lipophilic Sephadex LH20“

### 2.3.4 Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

Die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie hat zum Vorteil, dass diese Methode mehrere Informationen zur Charakterisierung eines komplexen Substanzgemisches gibt. Die HPLC diente in erster Linie der Trennung des Gemisches, und der DAD wurde für die Fingerprints der Komponenten bei verschiedenen Wellenlängen verwendet.

Die Voraussetzung für die Flüssigkeitschromatographie ist die Löslichkeit der Fraktionen und Extrakte, die anhand ihrer Polarität mit Hilfe der stationären Phase getrennt werden. Zur Verbesserung der Trennleistung wird häufig ein Gradient, d.h. eine Veränderung der Zusammensetzung der mobilen Phase, angewendet.

Die Massenspektrometrie basiert auf der Ionisierung und Fragmentierung der Substanzen, da nur geladene Teilchen detektiert werden können. Die entstandenen Ionen werden im elektrischen Feld beschleunigt und mittels Analysator nach ihrer Masse und Ladung aufgetrennt. Das daraus aufgezeichnete Massenspektrum setzt die Intensität der Ionen in Zusammenhang mit dem Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) und ermöglicht somit die Identifizierung der vorhandenen Substanzen.

Die Parameter der LC-MS werden in Tab. 11 und Tab. 12 aufgelistet.

HPLC	Dionex Ultimate 3000 RS
Temperatur	30°C
Elutionsmittel A	Essigsäures Wasser (pH 2,61)
Elutionsmittel B	Acetonitril
Einspritzvolumen	3µl
Flussrate	0,35ml/min
Gradient	Steigerung von Laufmittel B von 4% → 11% in 28min 11% → 31% in 20min 31% → 47% in 4min 47% → 100% in 2min 100% für 4min 100% → 4% in 1min 4% für 11min

**Tab. 11: Parameter der LC**



Gerät	Bruker Daltonics HCT	
Probeninfusion	LC-MS, LC-Bedingungen (s.Tab.10), Split ca. 1:8	
Ionenquelle	ESI; positiv und negativ Modus	
Massenanalysator	Ionenfalle	
Software	esquireControl Version 6.2 (Build 62.24) DataAnalysis Version 4.0 (Build 234)	
Modus	Standard/ Enhanced	
ESI-Parameter	Nebulizer:	22 psi
	Dry Temperature:	325,0 °C
	Dry Gas:	9,0 l/min
	Voltage Capillary:	±4,0 kV
Ionenfalle	Scan Range:	MS <sup>1</sup> : 100 – 1000 m/z MS <sup>n</sup> : 40 – 1000m/z
	Averages	MS <sup>1</sup> : 5 Spektren MS <sup>n</sup> : 3 Spektren
MS/MS Parameter	Isolation Width	4,0
	Precursor Ions	2
	AutoMS (2)	
	Precursor Ions	2
	AutoMS (3)	
	Fragmentierungs-Amplitude	MS <sup>1</sup> : 0,7; MS <sup>n</sup> : 1,0

Tab. 12: Parameter der MS

## 2.4 Arginin-Citrullin-Konversions-Assay (ACCA)

Zur aktivitätsgeleiteten Fraktionierung kam der Arginin–Citrullin–Konversions–Assay zum Einsatz, der die Wirkung auf die endotheliale NO-Synthase messbar macht. Das Prinzip beruht auf der Umsetzung des L-Arginins unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff in L-Citrullin und NO, und verdeutlicht somit die NO-Freisetzung aus den Endothelzellen<sup>16</sup>.

Der Bioassay wurde mit menschlichen Endothelzelllinien EA.hy926 durchgeführt, deren Zellen zunächst in genau definierter Konzentration in 6-Well-Zellkulturplatten drei Tage lang ausgesät werden und im Anschluss daran 24 Stunden mit den Extrakten, Fraktionen oder Reinsubstanz inkubiert und mit Puffer gewaschen. Durch Zugabe des [<sup>14</sup>C] markiertem L-Arginins und des Ca<sup>2+</sup>-Ionophor A23187 kommt es zum Umsatz der Aminosäure in das L-Citrullin und NO<sup>17</sup> (s.Abb. 7). „Die Stimulation mit dem Ionophors dient der grundlegenden Anhebung der stimulierten und basalen NO-Produktion in den Zellen“<sup>18</sup>. Die Aminosäuren werden nach 25 Minuten Reaktionszeit und darauffolgende Lyse extrahiert und auf Dünnschichtchromatographieplatten aufgetragen. Nach durchgeführter Trennung erfolgt die Autoradiographie (s. Abb. 9), die zur Visualisierung der radioaktiven Aminosäuren L-Arginin und L-Citrullin dient und somit eine Quantifizierung möglich macht.

„Der prozentuelle Umsatz von Arginin zu Citrullin ist ein Maß für die Aktivität der eNOS.“<sup>19</sup>.

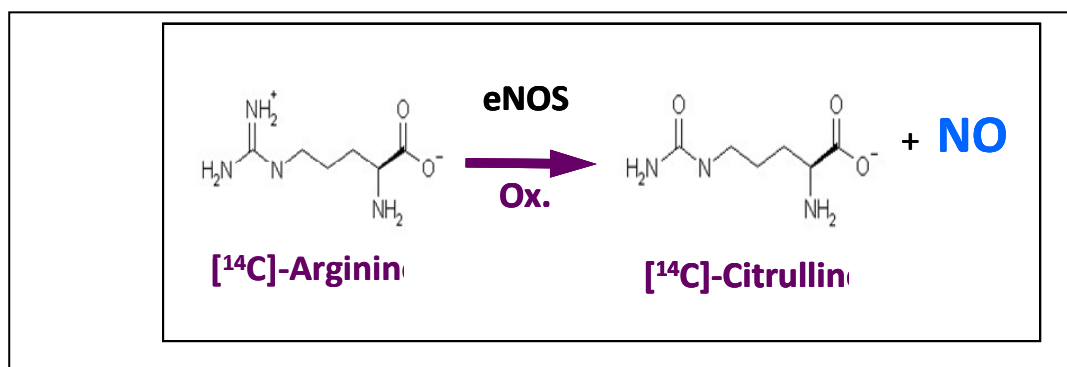


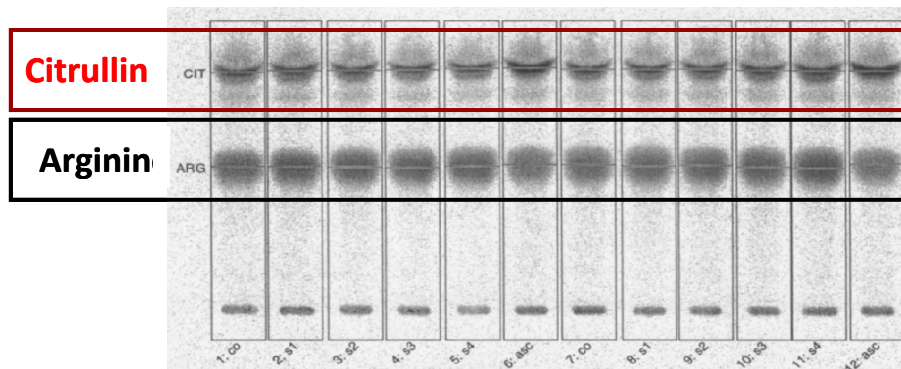
Abb. 9: Umsatz von Arginin in NO und Citrullin durch eNOS

<sup>16</sup> Räthel (2005)

<sup>17</sup> Leikert (2002)

<sup>18</sup> Räthel (2005)

<sup>19</sup> Räthel (2005)



**Abb.9 : Autoradiogramm mit den relevanten Zonierung (Arginin, Citrullin)**

## 2.5 Western Blot auf eNOS

Der Western Blot wurde zur quantitativen Bestimmung vom eNOS-Protein aus dem Zelllysat eingesetzt. Diese Methode basiert auf einer elektrophoretischen Auftrennung der Proteine anhand ihrer Molekülgröße auf einem Polyacrylamid-Gel, die im Anschluss auf eine Membran geblottet (übertragen) werden. Die selektive Markierung der Proteine wird durch Einsatz eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers durchgeführt und mit Hilfe eines Zweitantikörpers detektiert. Der zweite Antikörper wird mit einem Enzym markiert und hat dadurch die Aufgabe, das zugeführte Substrat entsprechend der Antikörpermenge umzusetzen. „Bei der enzymatischen Reaktion werden entweder Farbstoffe gebildet oder Energie in Form von Licht freigesetzt“<sup>20</sup>. Die Quantifizierung erfolgt anhand des enzymatischen Umsatzes, der proportional der nachzuweisenden Proteinmenge ist.

Für diese Methode wurden EA.hy926 Zellen in 6-Well-Zellplatten ausgesät und über den Zeitraum von 20h mit den Testsubstanzen stimuliert. Anschließend wurden die Platten auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und 2x mit PBS gewaschen. Weiters wurden 100µl Lysepuffer in jedes Well gegeben, dem 40µl Complete® Stocklösung und Protease-Inhibitor zugesetzt worden waren<sup>21</sup>. Die Zusammensetzung des Lysepuffers ist aus der Tab. 13 zu entnehmen. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen abgekratzt, in Eppendorfgefäße überführt

<sup>20</sup> Räthel (2005)

<sup>21</sup> Räthel (2005)

und zur Inkubation für 15min auf Eis gestellt. Nach 30s Behandlung im Ultraschallbad (Sonicator: 70% / 5 Impulse), wurde das Lysat für 30min bei 13000upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in den Eppendorfgefäße abpipettiert. Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge wurde die Methode nach Bradford herangezogen.

Lysepuffer (pH 7,5)

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Einwaage (25ml)</b>
Tris-HCl	50 mM	197,7 mg
EDTA	0,5 mM	3,6 mg
EGTA	0,5 mM	4,7 mg
DTT	2 mM	7,7 mg
Glutathion	7 mM	53,7 mg
Glycerol	10 %	2,5 ml
CHAPS	20 mM	308,0 mg
H <sub>2</sub> O Milli-Q		ad 25 ml

**Tab. 13: Zusammensetzung des Lysepuffers für den Western Blot**

Die Probensamples wurden in neue Eppendorfgefäße überführt und mit einem dreifach Samplepuffer versetzt und 5min bei 95°C aufgekocht. Dies bewirkt eine reduktive Spaltung der Disulfidbrücken zwischen den Aminosäurensträngen, sowie eine Denaturierung der Proteine und Bildung von negativen Ladungen, die bei der Anlagerung an das SDS entstehen. Somit wurden die Proteine auf die Auftrennung vorbereitet und ermöglichen eine Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht.

Für die Elektrophorese wurden jeweils 20µg Protein und 5-6µl Marker pro Tasche aufgetragen, die nach Transfer des Sammelgels in das Trenngel übertraten. Die Trennung erfolgte 70min bei konstanten 30mA.

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel via Tank-Plot-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen. Der Transfer wurde bei konstanten 100V über 1h25min durchgeführt.

Bei der darauffolgenden Proteindetektion wurde die Membran für 1h in 25ml 5% Milchpulver blockiert, mit TBS-T gespült und 3x10min mit demselben Reagenz gewaschen. Die Zusammensetzung des TBS-T ist in Tab.14 angegeben.

TBS-T (pH 7,4)

Substanz	Einwaage (1000ml)
Tris Base	3,0g
NaCl	11,1g
Tween 20	1,0ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000ml

**Tab. 14: Zusammensetzung des TBS-T für den Western Blot**

Weiters wurde die Anti-eNOS-Antikörper-Lösung hinzugefügt und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde mit einem sekundären Antikörper 1,5h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde wiederum mit TBS-T und Wasser gewaschen und mit Hilfe eine Chemolumineszenzreagenz (ECL, s. Tab. 15) konnte die Detektion mit LAS 3000 durchgeführt werden. Aufgrund des verwendeten Markers erfolgte die Identifizierung der eNOS-Proteinbande bei 133kDA.

ECL Western Blotting Detection Reagents :

Substanz	Einwaage
dd H <sub>2</sub> O	4,5ml
Tris Base pH 8,5	500µl
Luminol	25µl
p-Coumaric Acid	11µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3µl

**Tab. 15: Zusammensetzung des ECL-Reagenz für den Western Blot**

### 3 EXPERIMENTELLER TEIL

Der experimentelle Teil dieser Diplomarbeit befasst sich mit den Resultaten der durchgeführten Untersuchungen, sowohl der Analysenmethoden, als auch der Bioassays.

Zu Beginn wurden die hergestellten Fraktionen der Traubenbestandteile und des Weinlaubs mit Hilfe der Bioassays auf ihre eNOS-Aktivität untersucht (ACCA). Die Ergebnisse zeigten, dass größtenteils die MeOH-Fraktionen des Probenmaterials einen positiven Effekt auf die endotheliale NO-Synthase bewirken (s. Kap. 3.1.2, 3.2.2). Aus diesem Grunde wurde der Schwerpunkt auf diese Extrakte gelegt und für weitere Fraktionierungsschritt und Analysen herangezogen. Die Auftrennung erfolgte durch das Ausschütteln der MeOH-Extraktionen mit EA und H<sub>2</sub>O, wodurch sich die enthaltenen Inhaltsstoffe in den beiden Phasen verteilten (s. Kap. 3.1.3, 3.2.3). Die erhaltenen polaren und apolaren Phasen der Traubenbestandteile und des GWL und RWL wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (s. Kap. 3.1.3.1, 3.2.3.1) und HPLC (s. Kap. 3.1.3.2, 3.2.3.2) charakterisiert und verglichen, um Übereinstimmungen und Unterschiede zu zeigen. Die EA- und H<sub>2</sub>O-Fraktionen wurden ebenfalls auf ihre eNOS-Aktivität untersucht und die Ergebnisse ermöglichten somit eine weitere Auftrennung der aktiven Inhaltsstoffe (s. Kap. 3.1.3.3, 3.2.3.3). Dies erfolgte unter Einsatz der Gelchromatographie und durch Subfraktionierung konnte auf einzelne aktive Substanzen geschlossen werden (s. Kap. 3.1.4). Im Anschluss an diese Trennmethode erfolgten wiederum der ACCA (s. Kap. 3.1.4.2) und chromatographische Vergleiche des Inhaltsstoffmusters, um die möglichen aktivierenden Substanzen einzuengen und die Trennleistung zu beurteilen (s. Kap. 3.1.4.1).

Die MeOH-Fraktion des RWL wurde weiters anhand der Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie analysiert, um besseren Aufschluss über die Inhaltsstoffe zu bekommen (s. Kap. 3.2.3.5).

Als Abschluss dieser praktischen Arbeit kam der Western Blot zum Einsatz, der die Wirkung der Fraktionen und Subfraktionen auf die Proteinexpression der eNOS feststellen ließ (s. Kap. 3.1.4.3, 3.2.5.4). Die Resultate können jenen des ACCA's entsprechen, d.h. eine erhöhte eNOS-Expression ist verantwortlich für

eine gesteigerte NO-Freisetzung, oder die eNOS-Expression und NO-Freisetzung korrelieren nicht, worauf man auf eine Aktivierung des Enzyms schließen kann.

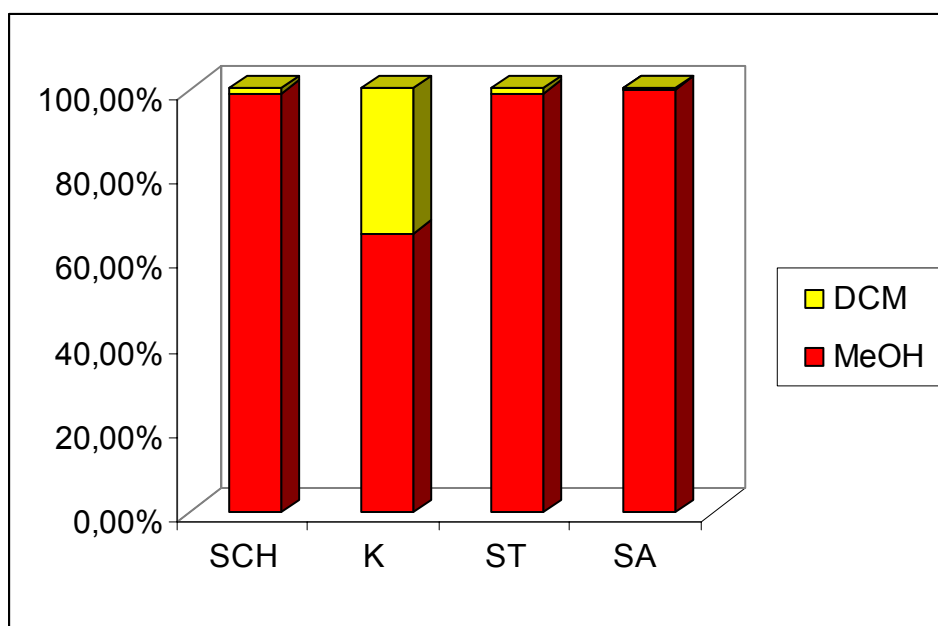
### 3.1 Analyse der Traubenbestandteile

#### 3.1.1 Fraktionierte Extraktion der Traubenbestandteile

Zu Beginn wurden jeweils drei Ansätze der einzelnen Traubenbestandteile mit den Lösungsmitteln MeOH (HPLC-Qualität) und DCM (p.a) hergestellt, vereint und unter Druckverminderung zur Trockene eingedampft (s. Kap. 2.2.1). Die Ausbeuten der Extrakte sind aus Abb. 10 und Tab. 16 zu entnehmen.

<b>SCH :</b> Einwaage: 3,0 g Gesamte Ausbeute: 2,46 g  MeOH-Fraktion: 98,78% DCM-Fraktion: 1,22%	<b>K :</b> Einwaage: 3,0 g Gesamte Ausbeute: 1,07 g  MeOH-Fraktion: 65,42% DCM-Fraktion: 34,58%
<b>ST :</b> Einwaage: 3,0 g Gesamte Ausbeute: 1,71 g  MeOH-Fraktion: 98,83% DCM-Fraktion: 1,17%	<b>SA :</b> Einwaage: 3,0 g Gesamte Ausbeute: 2,6 g  MeOH-Fraktion: 99,62% DCM-Fraktion: 0,38%

**Tab. 16: Ausbeuten der MeOH- und DCM-Fractionen der Traubenbestandteile**



**Abb. 10: Ausbeuten der MeOH- und DCM-Fractionen der Traubenbestandteile**

Es ist ersichtlich, dass die MeOH-Extrakte die größten Ausbeuten zeigen, wohingegen die Menge an DCM-Extrakte gering ist. Eine Ausnahme liefern die Fraktionen der Kerne, die aufgrund der enthaltenen apolaren Inhaltsstoffe eine große Ausbeute der DCM-Fraktion aufweisen.

### 3.1.2 Bioassay-Ergebnisse der MeOH- und DCM-Fractionen

Die dargestellten Diagramme in Abb. 11, 12, 13 und 14, zeigen die Ergebnisse auf die eNOS-Aktivität der einzelnen Traubenbestandteile. Die DCM- und MeOH-Fractionen werden auf den Kontrollwert (1) normiert („n“ steht für die Anzahl der Versuche).

Anhand der Diagramme wird deutlich, dass die DCM-Fractionen eine negative Wirkung auf die NO-Bildung zeigen. Im Falle der DCM-Fraktion der SCH (s. Abb. 11) konnten keine Ergebnisse erhalten werden, da es zu einer starken Beeinträchtigung der Zellen kommt. Die MeOH-Fractionen der SCH, K und ST zeigen hingegen eine Aktivitätssteigerung der eNOS. Hingegen bewirkt die MeOH-Fraktion des SA keine gesteigerte NO-Bildung (s. Abb. 11-14). Einen eindeutigen



Effekt weist die SCH-MeOH-Fraktion auf, die im Vergleich zu K, SA und ST eine deutlich erhöhte NO-Bildung bewirkt.

Bezüglich dieser Ergebnisse wurden die MeOH-Fractionen für weitere Untersuchungen verwendet, um die wirksamen Substanzen zu identifizieren.

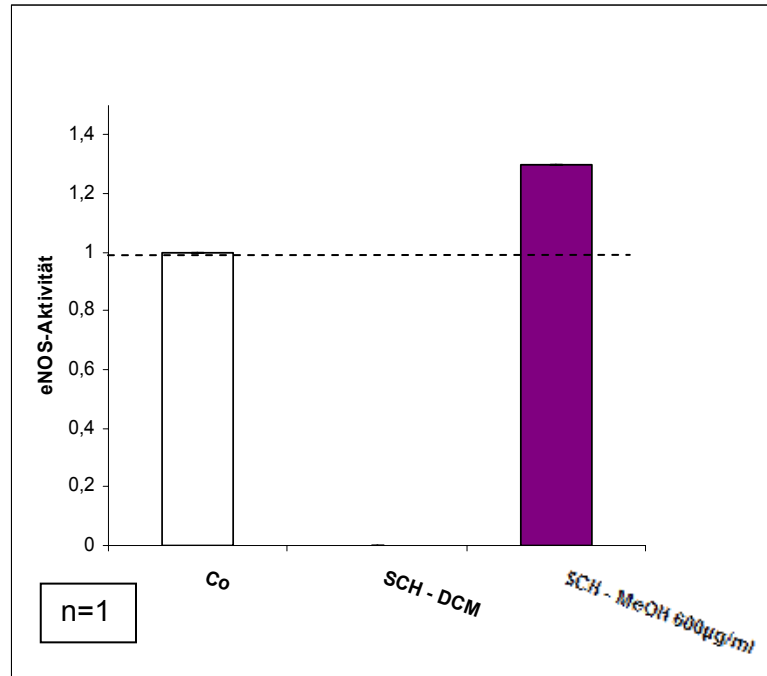


Abb. 11: Bioassay-Ergebnisse der MeOH- und DCM-Fractionen der Schalen

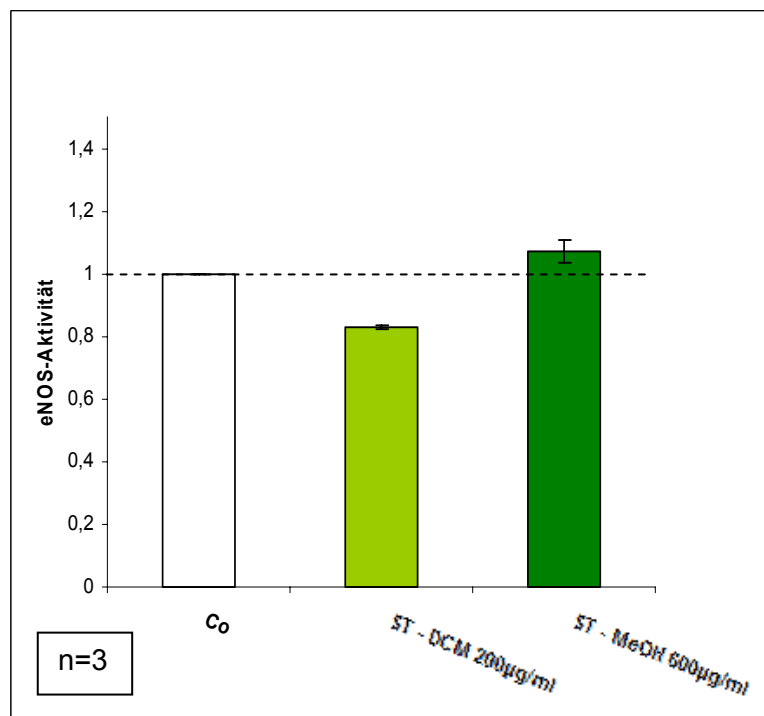
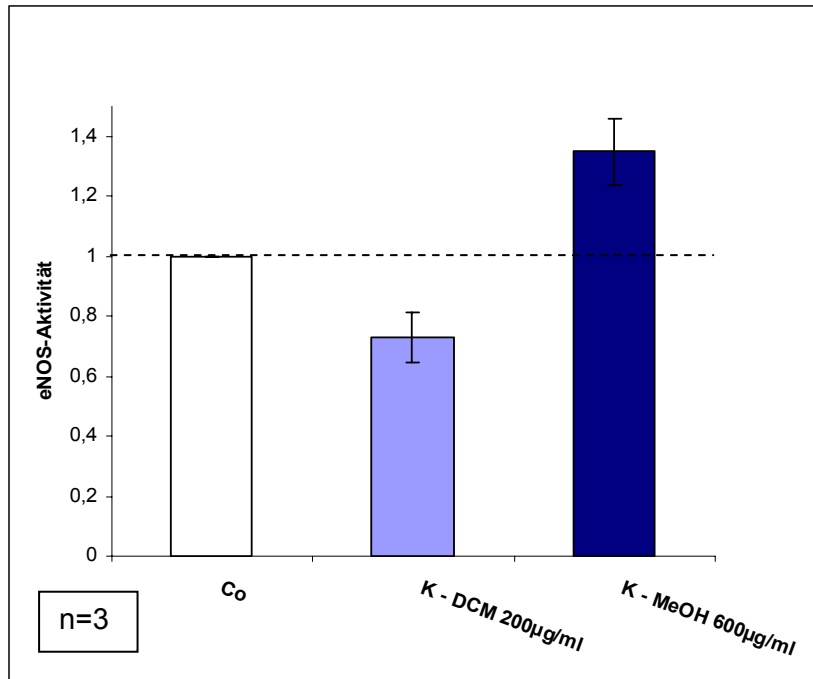
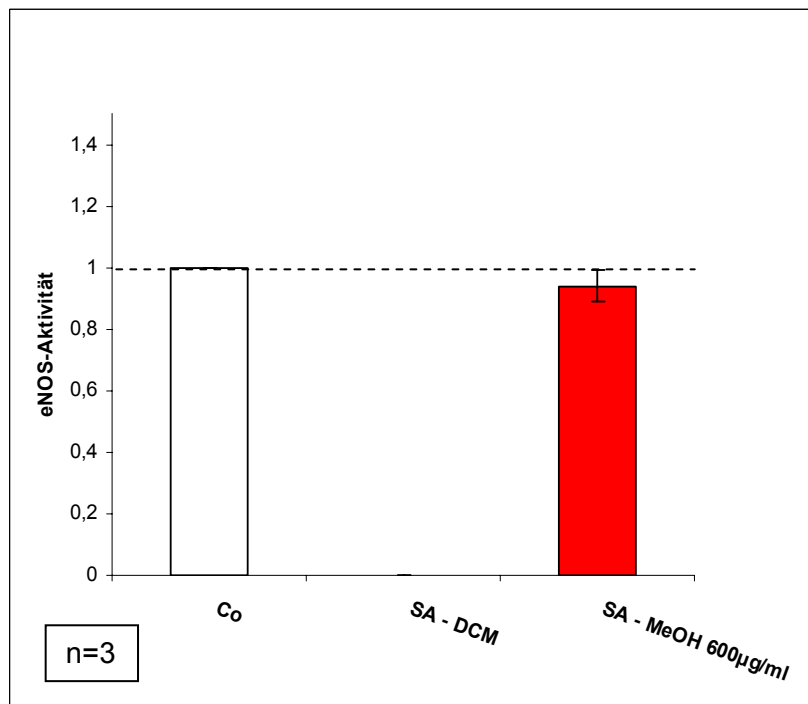


Abb. 12: Bioassay-Ergebnisse der MeOH- und DCM-Fractionen des Stängel



**Abb. 13: Bioassay-Ergebnisse der MeOH- und DCM-Fractionen der Kerne**



**Abb. 14: Bioassay-Ergebnisse der MeOH- und DCM-Fractionen des Saftes**

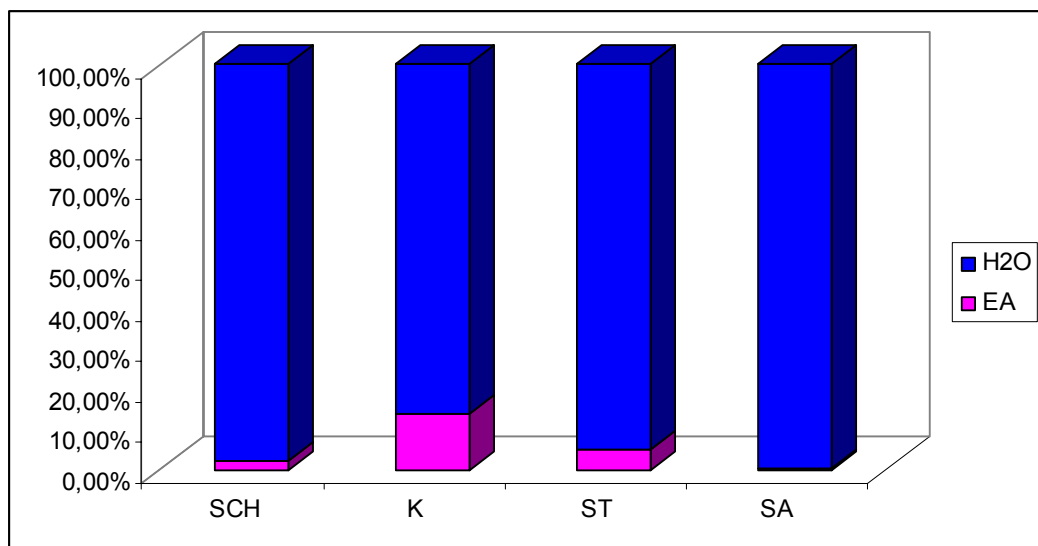
#### 3.1.3 Analyse der EA- und H<sub>2</sub>O-Fractionen

Anschließend wurden die MeOH-Fractionen unter Verwendung von Wasser und Ethylacetat in eine polare (H<sub>2</sub>O) Phase und eine apolare (EA) Phase aufgetrennt.

Die Inhaltsstoffe sollten sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität in einer der beiden Phasen anreichern. In der H<sub>2</sub>O-Phase befinden sich möglicherweise Fruchtsäuren, Gerbstoffe und Oligomere, im Gegensatz dazu weist die EA-Phase hauptsächlich Flavonoide auf. Die Ausbeuten der unterschiedlichen Fraktionen sind in Abb. 15 und Tab. 17 dargestellt.

<b>SCH :</b> Einwaage: 500,58mg Gesamte Ausbeute: 414,65mg  EA-Fraktion: 1,22% H <sub>2</sub> O-Fraktion: 98,78%	<b>K :</b> Einwaage: 500,07 mg Gesamte Ausbeute: 500,00 mg  EA-Fraktion: 13,83% H <sub>2</sub> O-Fraktion: 86,17%
<b>ST :</b> Einwaage: 500,44mg Gesamte Ausbeute: 286,21mg  EA-Fraktion: 5,01% H <sub>2</sub> O-Fraktion: 94,99%	<b>SA :</b> Einwaage: 499,94 mg Gesamte Ausbeute: 408,47mg  EA-Fraktion: 0,45% H <sub>2</sub> O-Fraktion: 99,55%

**Tab. 17: Ausbeuten der Traubenbestandteile des MeOH-Extraktes**



**Abb. 15: Ausbeuten der Traubenbestandteile des MeOH-Extraktes (relativ)**

Die Auftrennung der Inhaltsstoffe zeigt, dass es sich dabei hauptsächlich um polare Substanzen handelt, da die Ausbeute der H<sub>2</sub>O-Fraktion im Vergleich zu der EA-Fraktion deutlich höher ist. Die Kerne enthalten, wie bereits in Kap.3.1.1

festgestellt wurde, aufgrund ihrer apolaren Inhaltsstoffe mengenmäßig größere Anteile in der EA-Fraktion.

#### **3.1.3.1 Dünnschichtchromatographische Analyse der EA- und H<sub>2</sub>O-Fraktionen**

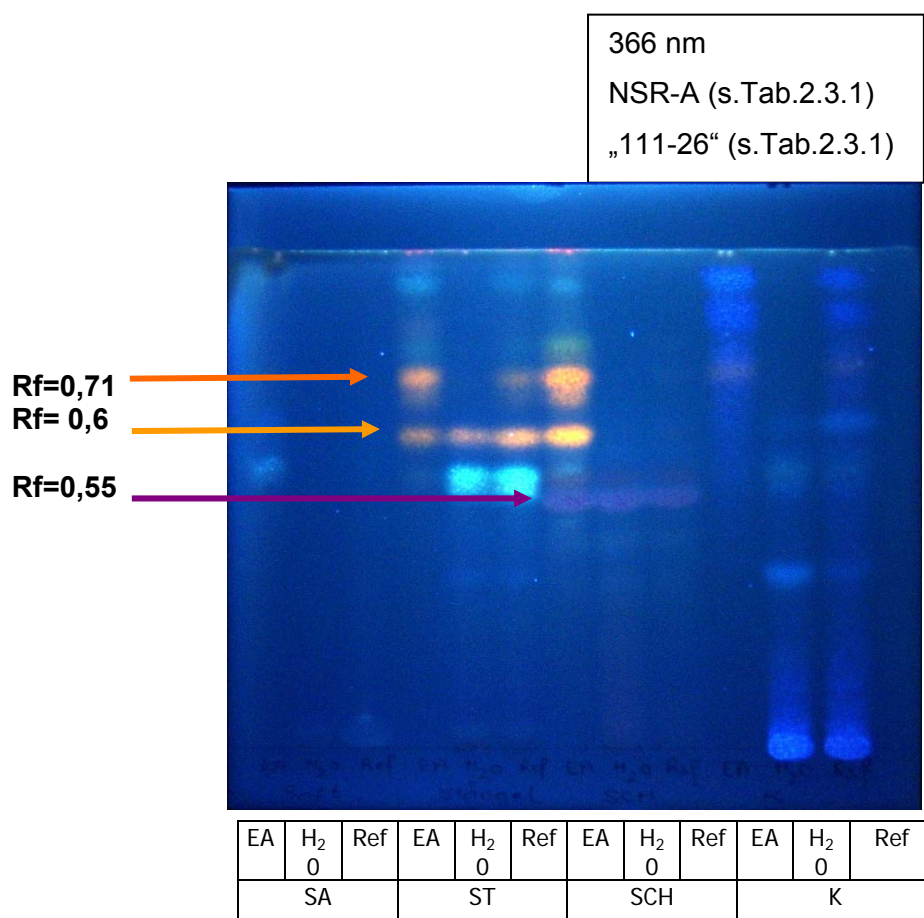
Im weiteren Verlauf wurden die EA- und H<sub>2</sub>O-Fraktionen der Traubenbestandteile mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie analysiert. Die Auftrennung der Extrakte erfolgte unter Einsatz der mobilen Phase „111-26“ (s. Kap. 2.3.1) und anschließendem Besprühen mit NSR-A (s. Kap. 2.3.1).

In Abb. 16 wird deutlich, dass die Fraktionen des SA-Extraktes kaum eine Auftrennung zeigen, da die polaren Substanzen am Start zurückgehalten werden. Charakteristisch ist, dass die polaren Inhaltsstoffe der H<sub>2</sub>O-Fraktionen der Traubenbestandteile bis zu einem R<sub>f</sub>-Wert=0,6 auf dem Chromatogramm visuell nachweisbar sind, hingegen sind die Zonierungen bei der apolaren EA-Fraktionen ab diesem R<sub>f</sub>-Wert erkennbar. Die dazugehörigen MeOH-Fraktionen weisen eine Gesamtheit der Banden auf, die in den EA- und H<sub>2</sub>O-Fraktionen sichtbar sind.

Bei Betrachtung der EA-Fraktionen von ST und SCH sieht man ein sehr ähnliches Inhaltsstoffmuster (R<sub>f</sub>=0,6). Die einheitlichen orangen Zonierungen, die auf Flavonoide hinweisen, sind womöglich Grund einer nicht quantitativen Trennung der Schalen von den Stängeln, oder diese Traubenbestandteile enthalten jene selben Inhaltsstoffe.

Die EA-Fraktionen der ST, SCH und der K weisen ebenfalls bei einem R<sub>f</sub>-Wert=0,71 eine identische Zonierung auf.

Die enthaltenen Anthocyane der SCH-Extrakte werden durch die violetten Zonierungen bei Tageslicht oder bei UV (366nm) mit NSR-A durch tiefrote bzw. löschende Zonen ersichtlich (R<sub>f</sub>=0,55) (s. Abb. 16).

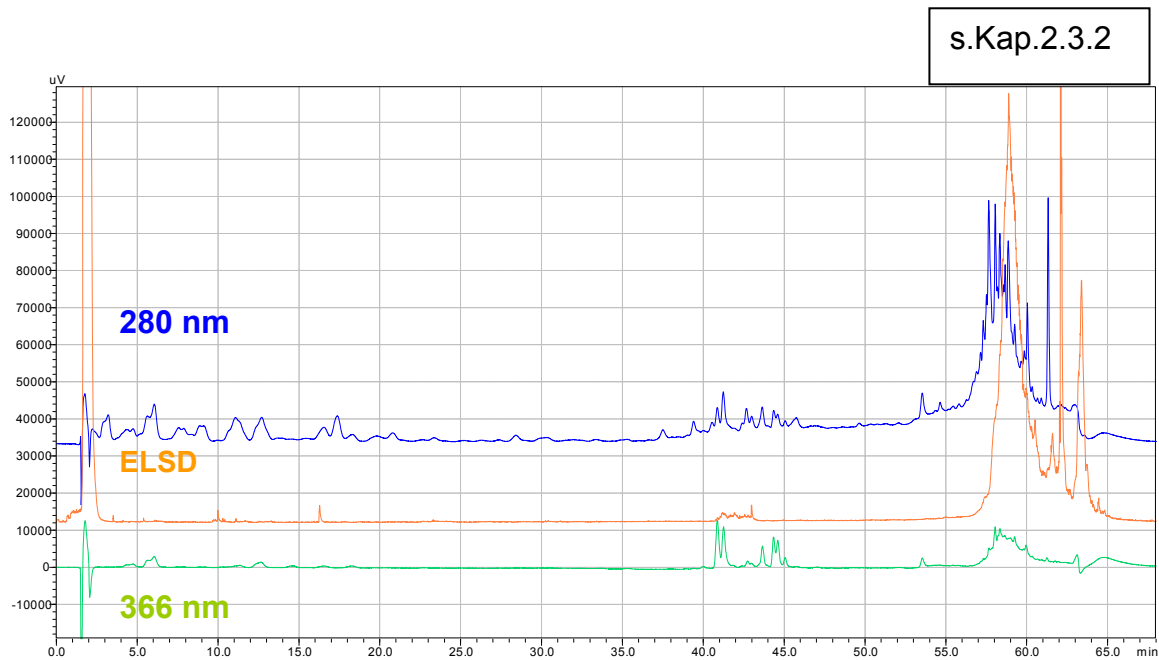


**Abb. 16: DC-Vergleiche der Extrakte der Traubenbestandteile („SA“, „SCH“, „K“, „ST“) nach Besprühen mit NSR-A bei 366 nm**

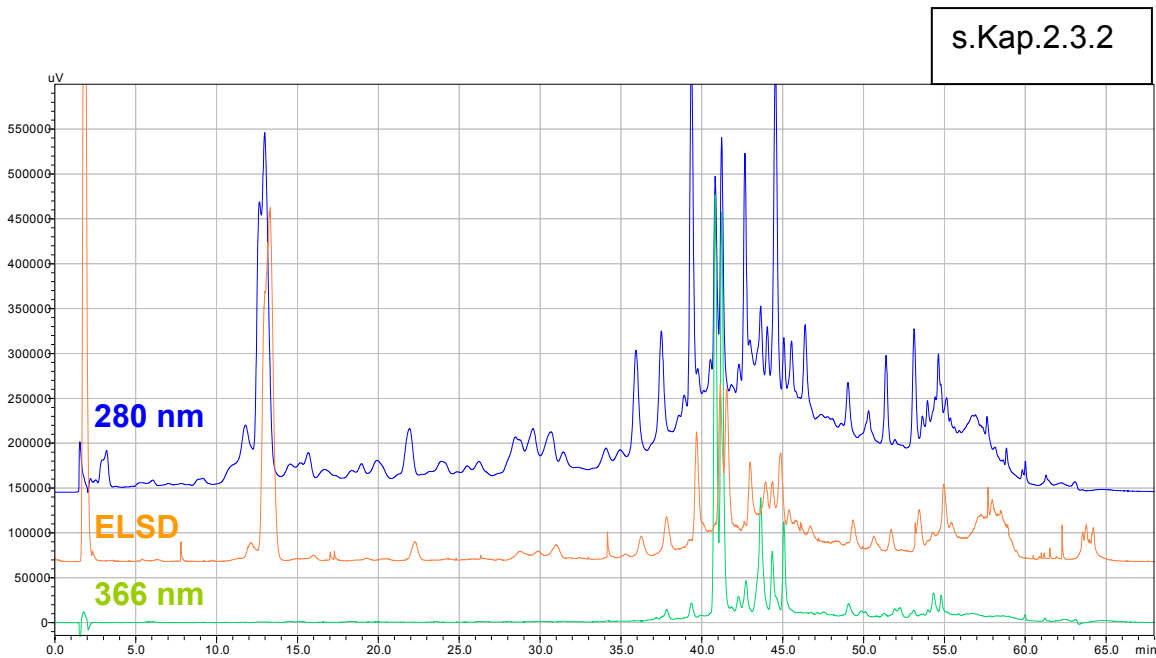
### 3.1.3.2 HPLC-Vergleiche der EA- und H<sub>2</sub>O-Fractionen

Bei den bereits durchgeführten Zelltests zeigten die EA-Fractionen eine gesteigerte NO-Produktion (s. Kap. 3.1.3.3) und wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit für fortlaufende Untersuchungen herangezogen. Die Analysen mit der HPLC wurden (s. Kap. 2.3.2) mit einem Diode Array Detektor und einem Lichtstreuendetektor durchgeführt. In dieser Arbeit wird das Hauptaugenmerk auf die Chromatogramme bei 280nm gelegt, da im Vergleich zu den Detektionen bei 366nm und mit dem ELSD die relevanten Peaks ab einer Retentionszeit von etwa 40min auch bei UV 280nm detektierbar sind. Dies wird in Abb. 17-20 ersichtlich. Die enthaltenen Flavonoide, die bei 366nm selektiv detektiert werden, sind im Fenster von 40min bis 45min ebenfalls bei 280nm sichtbar. Der Einsatz des

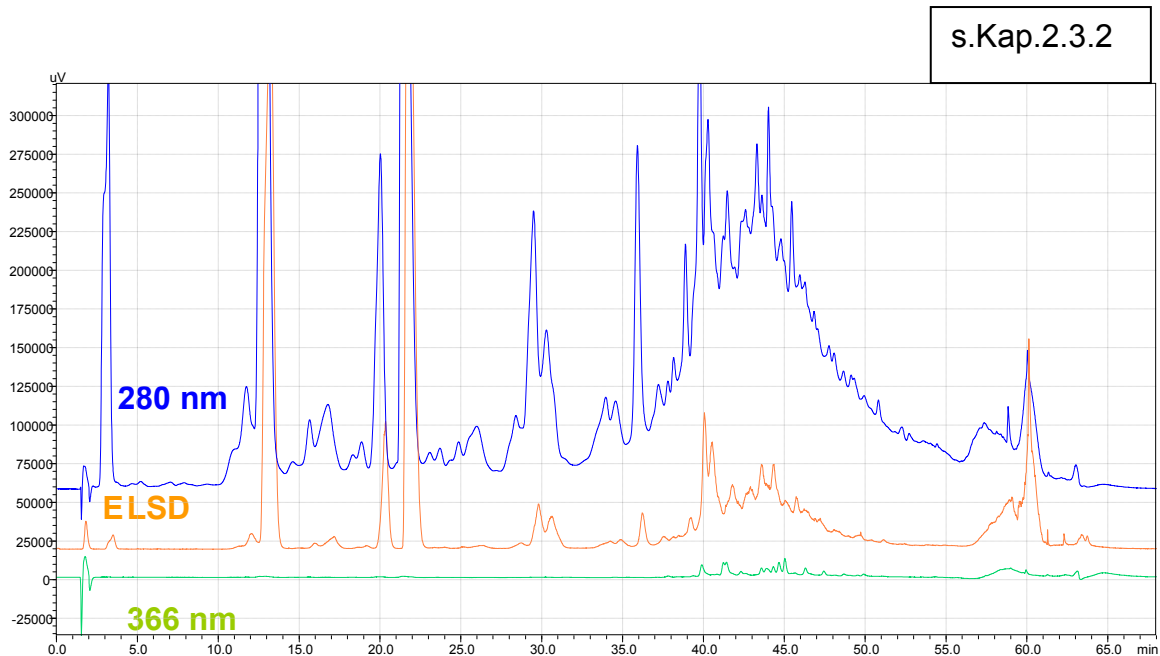
Lichtstreuendetektors hat lediglich den Vorteil, eine quantitative Gegenüberstellung der Fraktionen zu veranschaulichen.



**Abb. 17: HPLC-Vergleich der EA-Fractionen des Saftes bei 280nm, 366nm und mit ELSD**

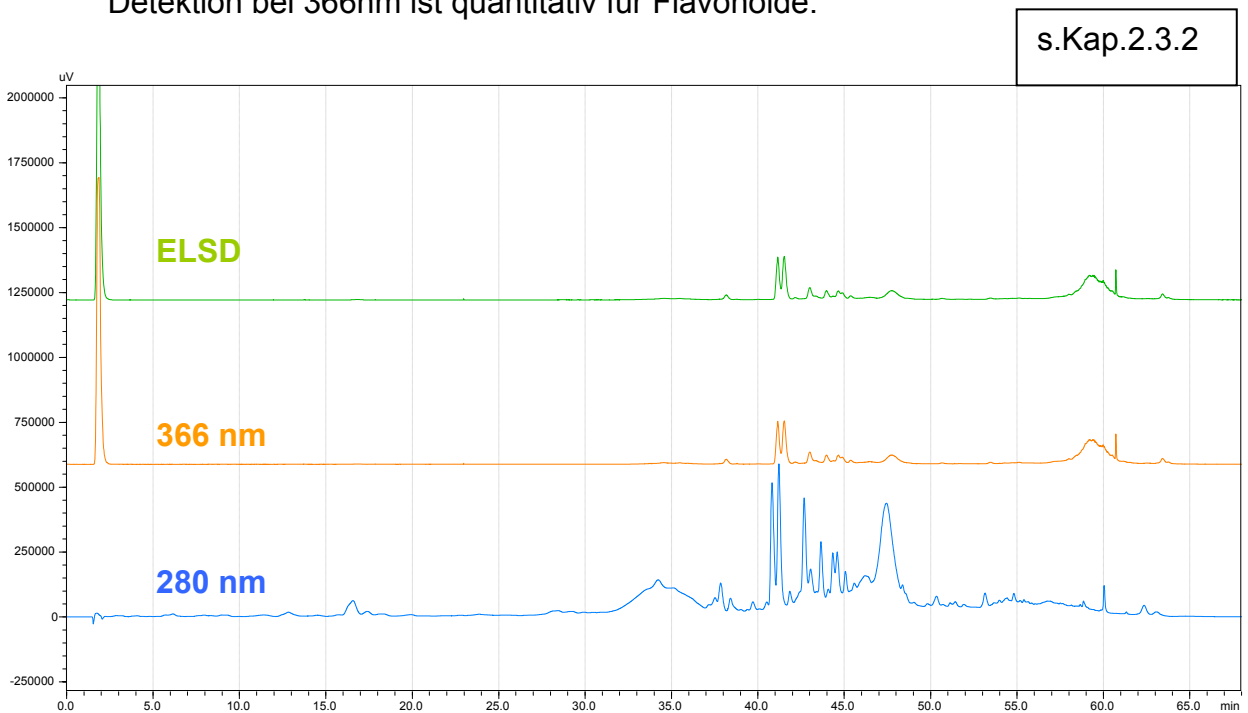


**Abb. 18: HPLC-Vergleich EA-Fractionen des Stängels bei 280nm, 366nm und mit ELSD**



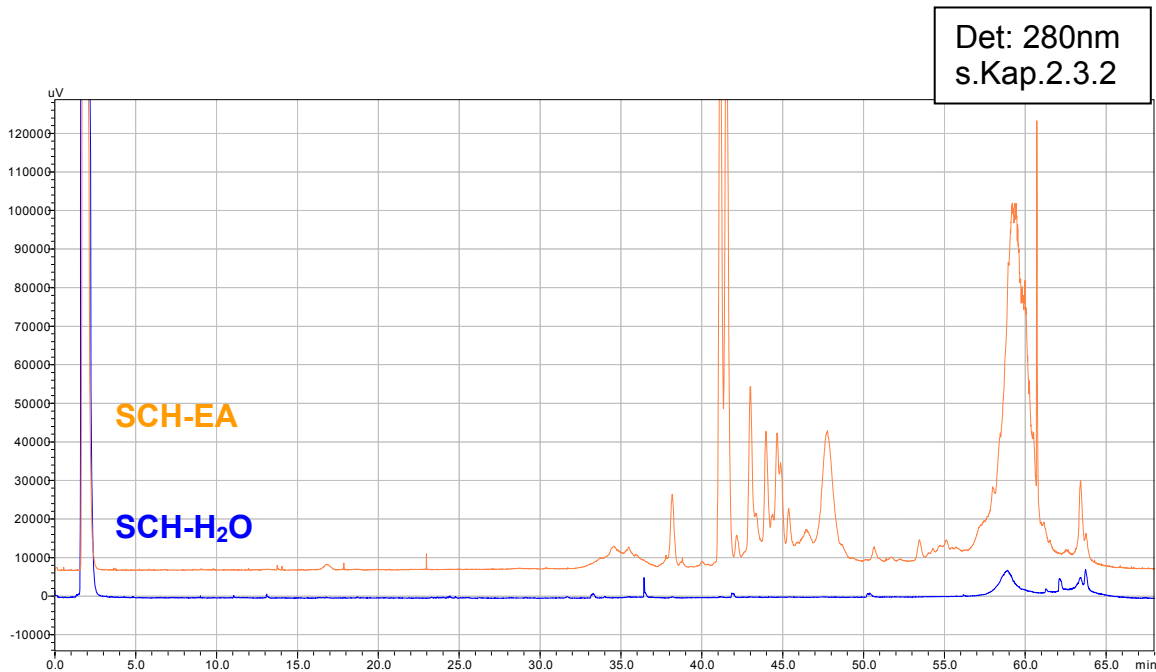
**Abb. 19: HPLC-Vergleich EA-Fractionen der Kerne bei 280nm, 366nm und mit ELSD**

Anhand der Abb.18 und Abb.19 zeigt sich, dass die EA-Fractionen des ST und der K größere Mengen an Flavonoiden enthalten (Retentionszeit Min.40-45). Die Detektion bei 366nm ist quantitativ für Flavonoide.

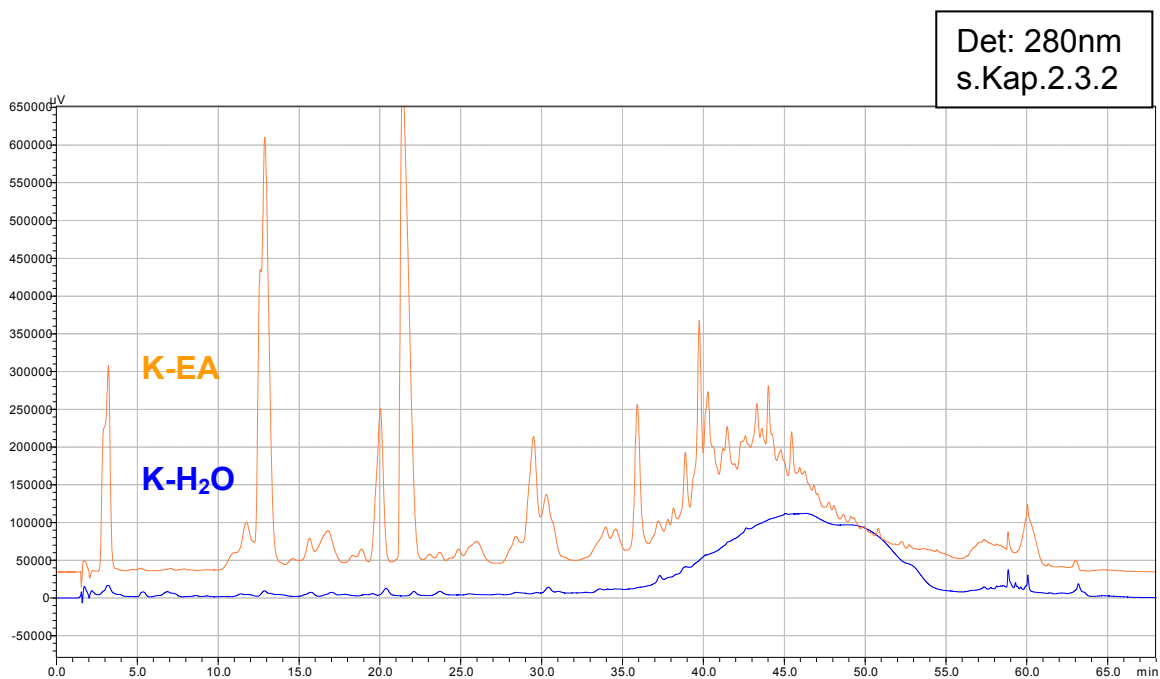


**Abb. 20: HPLC-Vergleich EA-Fractionen der Schalen bei 280nm, 366nm und mit ELSD**

In den nachfolgenden Chromatogrammen (Abb. 21-24) sind die Vergleiche der EA- und H<sub>2</sub>O-Fractionen der einzelnen Traubenbestandteile dargestellt. Anhand der Peaks zeigt sich, dass der Großteil der Inhaltsstoffe in der apolaren EA-Phase angereichert ist.

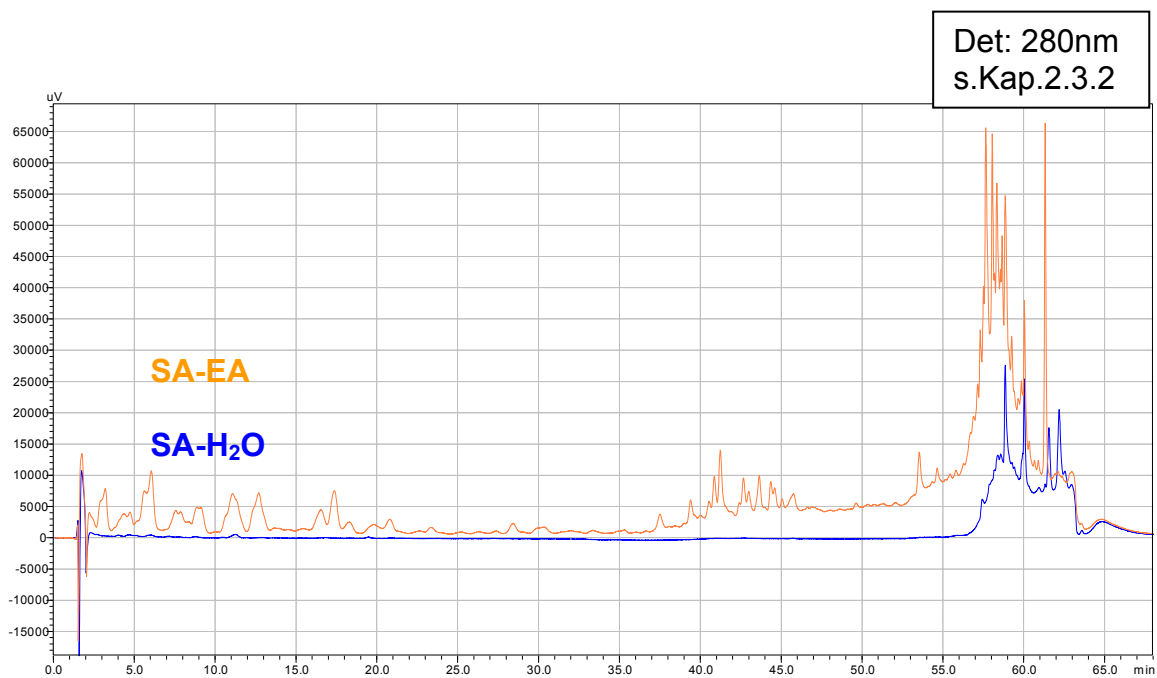
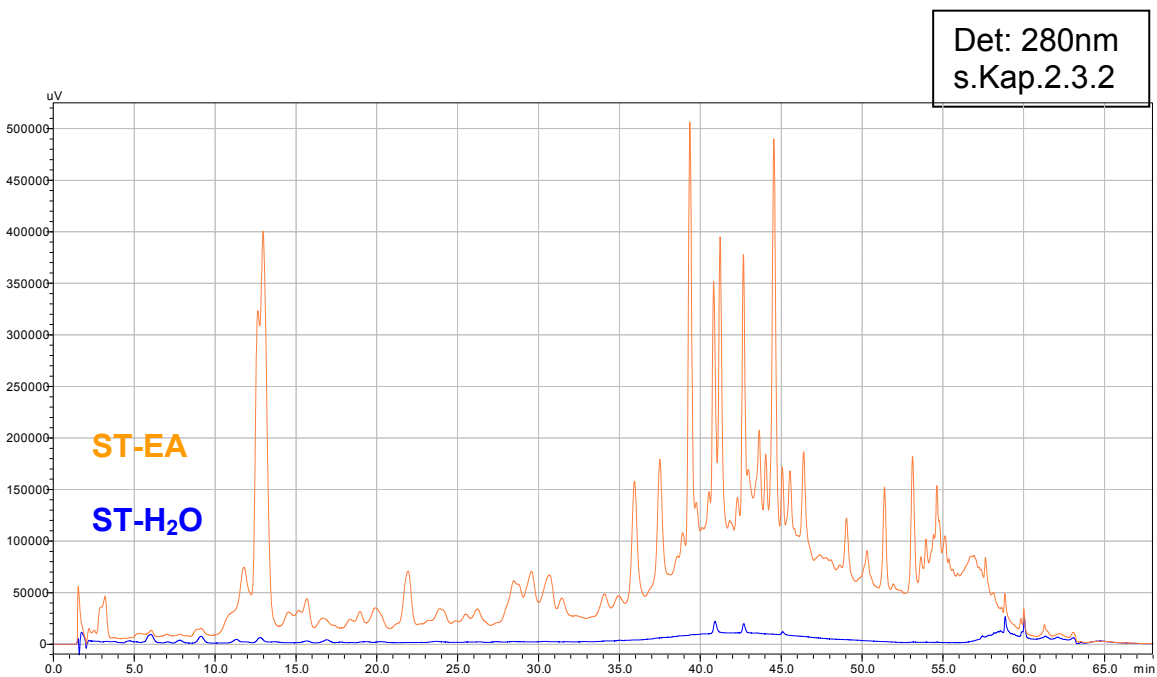


**Abb. 22: HPLC-Vergleich der EA- und H<sub>2</sub>O-Fraktion der Schalen**



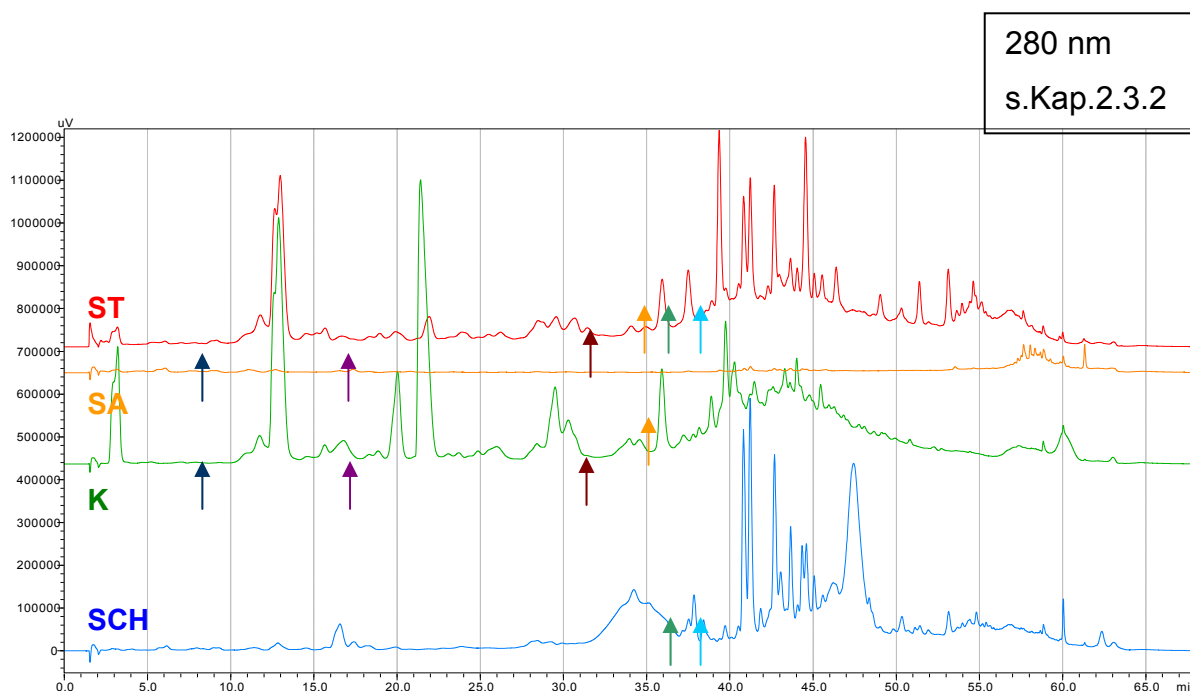
**Abb. 21: HPLC-Vergleich der EA- und H<sub>2</sub>O-Fraktion der Kerne**



Abb. 23: HPLC-Vergleich der EA und H<sub>2</sub>O-Fraktion des SaftesAbb. 24: HPLC-Vergleich der EA und H<sub>2</sub>O-Fraktion des Stängels

In Abb. 25 werden die EA-Fractionen der unterschiedlichen Traubenbestandteile bei 280nm verglichen. Die bereits im dünnenschichtchromatographischen Vergleich (s. Kap. 3.1.3.1) gezeigten Übereinstimmungen bestimmter Inhaltsstoffe der ST, SCH und K werden in diesem Chromatogramm bestätigt.

Die identischen Peaks sind mit verschiedenfarbigen Pfeilen markiert. Die EA-Fractionen der K und ST zeigen bei einer Retentionszeit von Minute 11 bis 13, 21,5 und Minute 36 einheitliche Peaks auf. Die ST-EA-Fraktion weist ebenfalls äquivalente Peaks (Minute 42; 44,5) mit der SCH-EA-Fraktion auf.

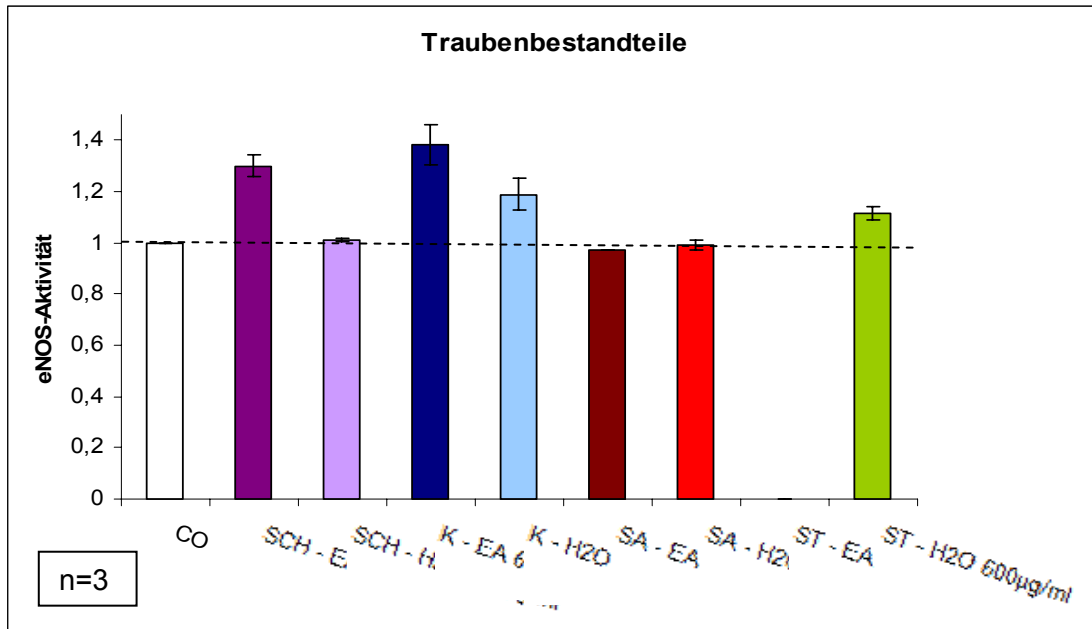


**Abb. 25: HPLC-Vergleich der EA-Fractionen von K, SA, SCH und ST**

### 3.1.3.3 ACCA-Ergebnisse der EA- und H<sub>2</sub>O-Fractionen

Folgend wurden die EA- und H<sub>2</sub>O-Fraktion der Traubenbestandteile im Bioassay auf ihre eNOS-Aktivität untersucht. Im Diagramm (s. Abb. 26) zeigt sich, dass sowohl die EA-Fractionen der SCH und K, als auch die polare Fraktion der K und ST eine gesteigerte NO-Bildung bewirken. Jedoch kommt bei der K-H<sub>2</sub>O-Fraktion aufgrund einer zu hohen Konzentration zu schweren Beeinträchtigungen der

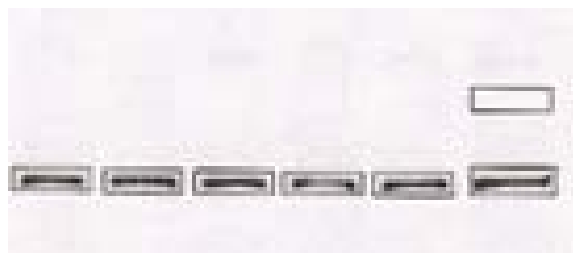
Zellfunktion und somit ist diese Wirkung nicht relevant. Im Falle der EA-Fraktion der Stängel konnten keine Ergebnisse erbracht werden, da die aufgetragene Konzentration zum Absterben der Zellen führte.



**Abb. 26: Bioassay-Ergebnisse der EA- und H<sub>2</sub>O-Fractionen der Traubenbestandteile**

### 3.1.3.4 Western Blot Ergebnisse der EA- und H<sub>2</sub>O-Fractionen

Die Wirkung der EA- und H<sub>2</sub>O-Fractionen auf die eNOS-Proteinexpression wurde mit dem Western-Blot-Verfahren analysiert (s. Kap. 2.5). Nach durchgeführter immunologischer Detektion, kann mit Hilfe des mitgeblotteten Markers die eNOS-Proteinbande (133kDA) identifiziert werden (s. Abb. 27).

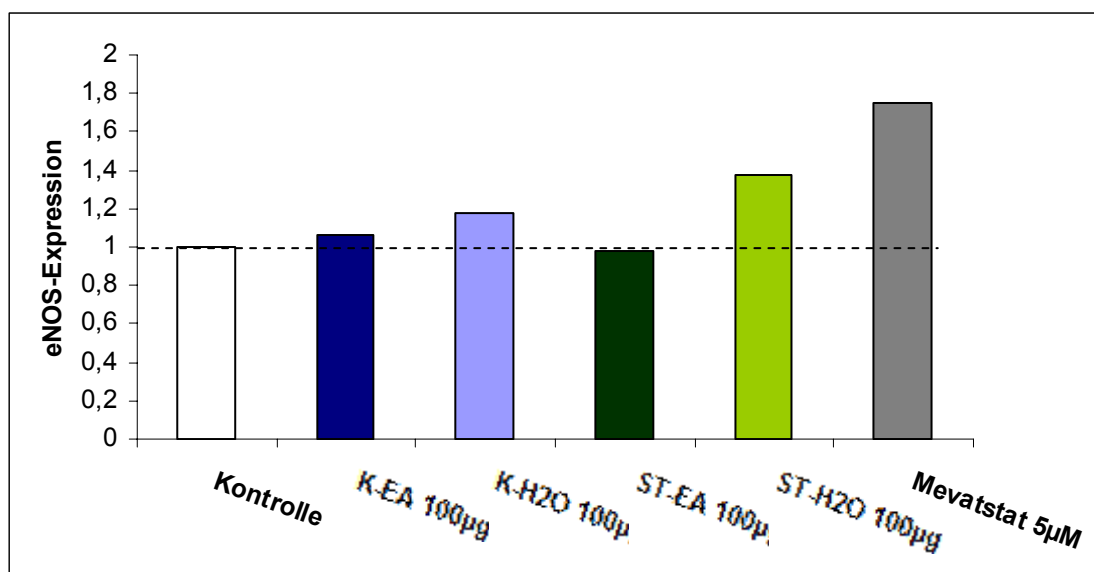


**Abb. 27 : Darstellung der eNOS-Bande bei 133kDA**

Bei diesem Verfahren wurde zusätzlich zu dem Kontrollwert (aus eins eingestellt) eine Positivkontrolle (Mevastatin) verwendet. Aus Tab. 18 und Abb. 28 ist zu entnehmen, dass Mevastatin, im Gegensatz zu den Fraktionen der Traubenbestandteile, die Expression der endothelialen NO-Synthase deutlich steigert. Die EA- und H<sub>2</sub>O-Fraktionen der K und ST zeigen eine Steigerung der eNOS-Proteinexpression. Weiters zeigt sich, dass die H<sub>2</sub>O-Fraktion der ST und K sowohl eine Aktivitätssteigerung der eNOS (s. Kap. 3.1.3.3), also auch einen geringen positiven Effekt auf die Proteinexpression des Enzyms bewirken.

Name	eNOS	alpha-Tub	eNOS/alpha Tub	Norm auf Co
<b>Kontrolle</b>	3137005	7650083	0,381882523	<b>1</b>
<b>K-EA 100µg</b>	3360947	8319742	0,403972503	<b>1,06</b>
<b>K-H<sub>2</sub>O 100µg</b>	3345719	7454089	0,448843447	<b>1,18</b>
<b>ST-EA 100µg</b>	2674558	7145908	0,374278258	<b>0,98</b>
<b>ST-H<sub>2</sub>O 100µg</b>	3015450	5726357	0,526591339	<b>1,38</b>
<b>Mevastat 5µM</b>	4011951	5988507	0,669941773	<b>1,75</b>

**Tab. 18: Western-Blot-Ergebnisse der EA- und H<sub>2</sub>O-Fraktionen der K und ST in Bezug auf eine gesteigerte eNOS-Proteinexpression**



**Abb. 28: Western-Blot-Ergebnisse der EA- und H<sub>2</sub>O-Fraktionen der K und ST in Bezug auf eine gesteigerte eNOS-Proteinexpression**

### 3.1.4 Analyse der SCH-MeOH-Subfraktionen

Zur Auffindung von möglichen wirksamen Einzelsubstanzen wurde ein weiterer Fraktionierungsschritt durchgeführt. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse, die deutlich machen, dass die MeOH-Fraktion der Schalen eine erhöhte NO-Freisetzung im Zellaassay bewirkt, fiel die Wahl auf diesen Traubenteil.

Zur Herstellung von Subfraktionen kam die Gelchromatographie (s. Kap. 2.3.3) zum Einsatz. Hierbei werden die enthaltenen Inhaltsstoffe aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße aufgetrennt und ermöglichen somit eine darauffolgende Analyse. Bei den ersten Subfraktionen (Subfraktion 1-11) handelte es sich um leere Fraktionen und stellten somit den Vorlauf dar. Diese wurde auch nicht weiter untersucht. Die Subfraktionen 14, 15 und 16 zeigen die höchsten Ausbeuten. Die Einwaage und Ausbeuten der einzelnen Subfraktionen sind in Tab. 19 und Tab. 20 dargestellt.

Einwaage	350,12mg
Absolute Ausbeute	323,53mg

**Tab. 19: Einwaage und absolute Ausbeute der SCH-MeOH-Subfraktionen**

<b>Subfraktion</b>	<b>Absolute Ausbeute (mg)</b>	<b>Relative Ausbeute</b>
13	4,67	1,44%
14	30,76	9,51%
15	217,8	67,32%
16	47,49	14,68%
17	6,26	1,93%
18	3,1	0,96%
19	3,77	1,17%
20	1,84	0,57%
21	1,1	0,34%
22	0,53	0,16%
23	0,49	0,15%
24	0,6	0,19%
25	0,38	0,12%
26	0,26	0,08%
27	0,25	0,08%
28	0,24	0,07%
29	0,18	0,06%
30	0,2	0,06%
31	0,19	0,06%
32	0,14	0,04%
33	0,05	0,02%
34	0,05	0,02%
35	0,21	0,06%
36	0,27	0,08%
37	0,16	0,05%
38	0,26	0,08%

**Tab. 20: Absolute und relative Ausbeuten der SCH-MeOH-Subfraktionen**

### 3.1.4.1 Dünnschichtchromatographischer Vergleich der Subfraktionen

Zur Überprüfung des Fraktionierungsschrittes wurde die Dünnschichtchromatographie (s. Kap. 2.3.1) angewandt und anhand der sichtbaren Banden analysiert. Die Untersuchung erfolgte mit den Subfraktionen 12 bis 26 und als Referenz kamen die EA- und MeOH-Fraktion der Schalen zum Einsatz.

Das Chromatogramm in Abb. 29 weist auf eine gute Trennung der Inhaltsstoffe hin. Die Subfraktion 15, die bereits bei der Betrachtung der Ausbeuten eine Ausnahme zeigte, wurde aufgrund der starken Anreicherung am Start zurückgehalten und nicht aufgetrennt. Die rote Bande ( $R_f$ -Wert=0,45) bei Subfraktionen 17, 18 und 19 kennzeichnet ein enthaltenes Anthocyan, die auch in der MeOH-Referenz deutlich erkennbar ist. Die Subfraktion 19 zeigt eine markante orange Bande bei einem  $R_f$ -Wert=0,66, die in keiner anderen Subfraktion vorhanden ist. Weiters ist bei einem  $R_f$ -Wert=0,76 ausschließlich in Subfraktion 24 eine orange und bei  $R_f$ -Wert=0,5 in Subfraktion 21 eine rote Zonierung sichtbar. Die blauen Banden in Subfraktionen 19, 20 und 21 ( $R_f$ -Wert=0,55) geben Hinweis auf die enthaltenen Phenolcarbonsäuren.

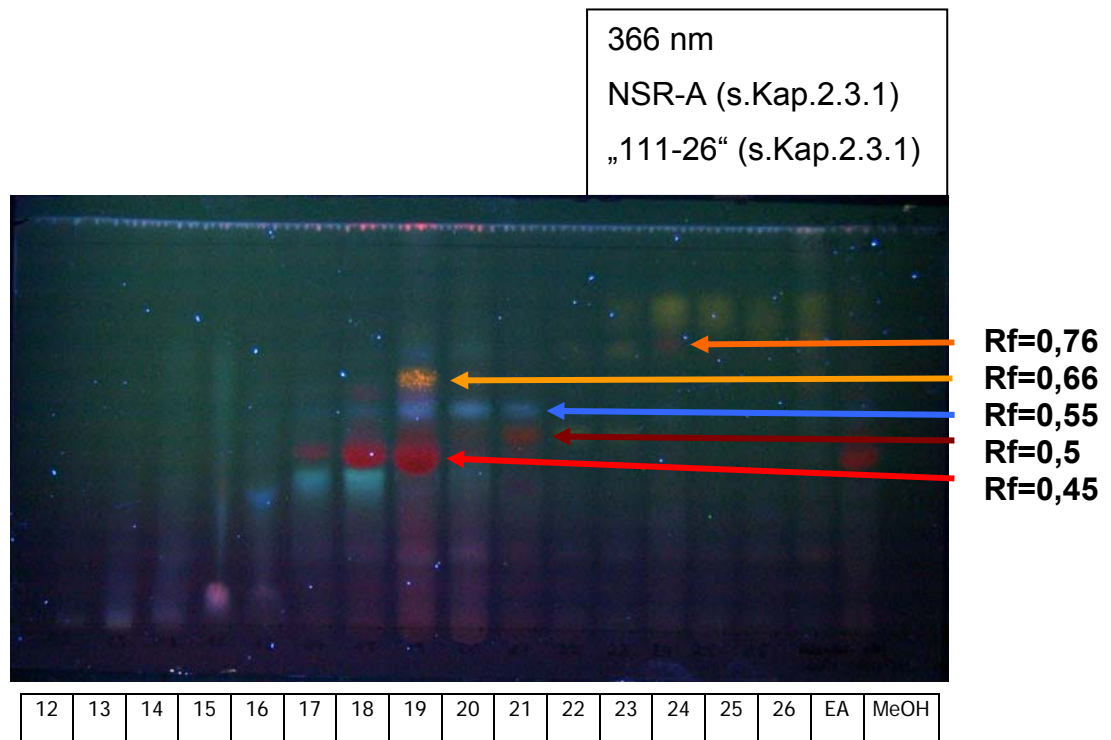


Abb. 29: Dünnschichtchromatographischer Vergleich der SCH-MeOH-Subfraktionen

Für weitere Untersuchungen wurden auf der einen Seite jene Subfraktionen gewählt, die im Chromatogramm Reinsubstanzen enthielten, und, um ein breites Spektrum der Inhaltsstoffe zu analysieren, selektierte man auf der anderen Seite die Subfraktionen mit mehreren Inhaltsstoffen. Die Wahl fiel auf Subfraktion 17, 19, sowie 13 und 15, die möglicherweise auch aktive Substanzen enthalten. Im Falle der Fraktionen 13 und 15 konnte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie keine Charakterisierung der Inhaltsstoffe vorgenommen werden, da sie keine Auftrennung zeigten. Die Ursache dafür liegt möglicherweise an einer zu hochkonzentrierten Auftragemenge bzw. an den enthaltenen polaren Substanzen.

#### 3.1.4.2 ACCA-Ergebnisse der Subfraktionen

Die durchgeführten Bioassays der SCH-Subfraktionen lieferten nicht die erhofften Ergebnisse. Die untersuchten Subfraktionen 13, 15, 17 und 19 der SCH zeigen im Gegensatz zur SCH-MeOH-Fraktion keine Aktivitätssteigerung der eNOS (s.Abb.30). Zurückzuführen ist dieser Umstand möglicherweise auf einen Synergismus der Inhaltsstoffe, d.h. die Wirkung wird durch die Gesamtheit der enthaltenen Substanzen bewirkt oder, die untersuchte Konzentration von 100µg/ml war zu hoch bzw. zu niedrig gewählt.

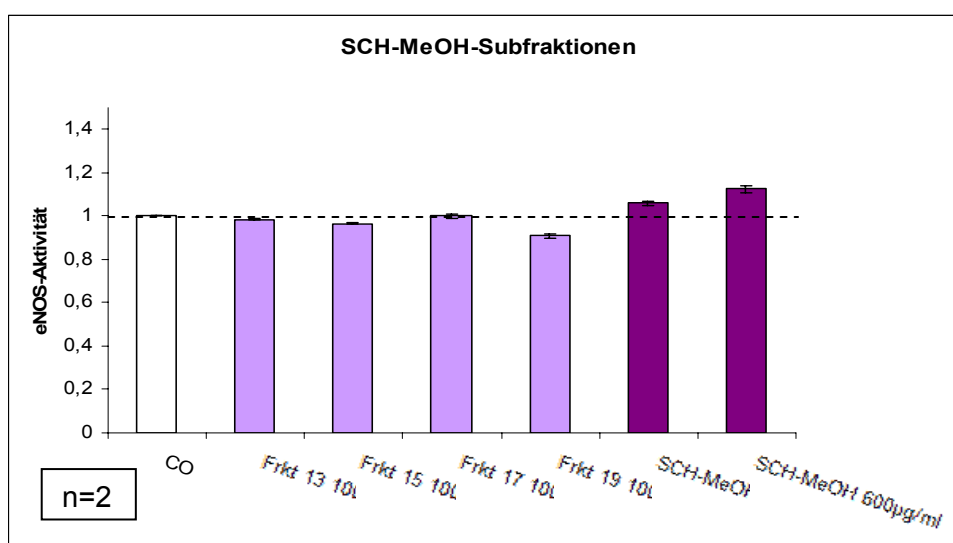


Abb. 30: Bioassay-Ergebnisse der SCH-MeOH-Subfraktionen



### 3.2 Analyse des Weinlaubs

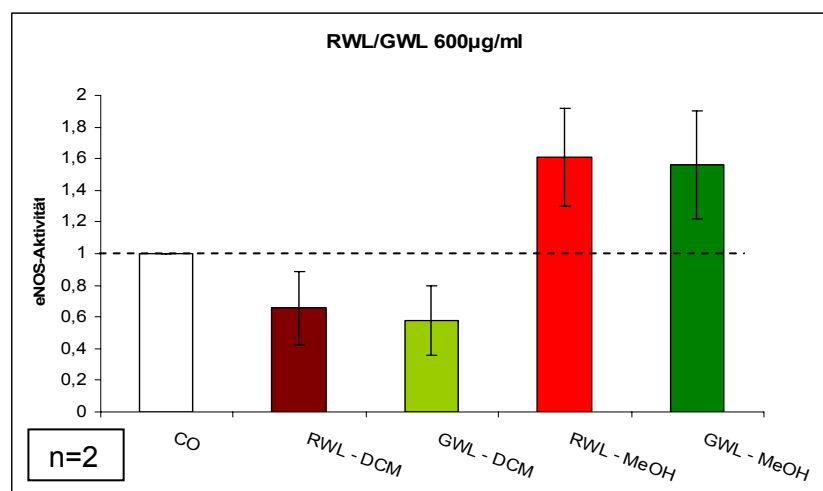
In der vorangegangenen Diplomarbeit wurden bereits Voruntersuchungen und Extraktionen durchgeführt, die zeigten, dass einerseits die Qualität des Lösungsmittel zur Herstellung von Extrakten einen erheblichen Einfluss auf die eNOS-Aktivität hat und andererseits die MeOH-Fractionen eine gesteigerte NO-Freisetzung bewirken<sup>22</sup>.

#### 3.2.1 Fraktionierte Extraktion des grünen und roten Weinlaubs

Basierend auf den Voruntersuchungen wurden mit MeOH (HPLC-Qualität) und DCM (p.a.) erneut Extrakte hergestellt und fortführend analysiert. Es wurden wiederum drei Parallelansätze pro Lösungsmittel erstellt, vereint und zum Trocknen gebracht.

#### 3.2.2 Bioassay-Ergebnisse der MeOH- und DCM-Extrakte

Die erhaltenen MeOH- und DCM-Extrakte wurden mittels ACCA (s. Kap. 2.4) bezüglich ihrer eNOS-Aktivität untersucht. Die MeOH-Extrakte des GWL und RWL weisen, wie auch jene der Traubenbestandteile (s. Kap. 3.1.2), einen positiven Effekt auf die NO-Bildung auf. Im Gegensatz dazu zeigen die DCM-Extrakte eine deutlich hemmende Wirkung (s. Abb. 31). Der Vergleich der GWL- und RWL-Extrakte lässt keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität erkennen. Aufgrund der Ergebnisse wurden die MeOH-Extrakte für weitere Analysen herangezogen.



**Abb. 31: Bioassay-Ergebnisse der DCM- und MeOH-Extrakte des G/RWL**

<sup>22</sup> Hager E.

### 3.2.3 Analyse der EA- und H<sub>2</sub>O-Fractionen

Im weiteren Schritt wurden die beiden MeOH-Extrakte, äquivalent den Traubenbestandteilen, unter Verwendung von Ethylacetat und Wasser in eine polare und apolare Fraktionen aufgetrennt. Das GWL und RWL zeigen ebenfalls eine hohe prozentuelle Ausbeute der H<sub>2</sub>O-Phase, wohingegen der Anteil der apolaren EA-Phase sehr gering ist. Die Ausbeuten sind aus Tab. 21 zu entnehmen und in Abb. 32 graphisch dargestellt.

Weinlaub	Einwaage (mg)	Absolute Ausbeute	EA-Fraktion	H <sub>2</sub> O-Fraktion
GWL	499,97 mg	482,95 mg	12,62%	87,38%
RWL	499,98 mg	392,46 mg	17,78%	82,22%

Tab. 21: Ausbeuten der EA- und H<sub>2</sub>O-Fractionen des Weinlaubs (GWL und RWL)

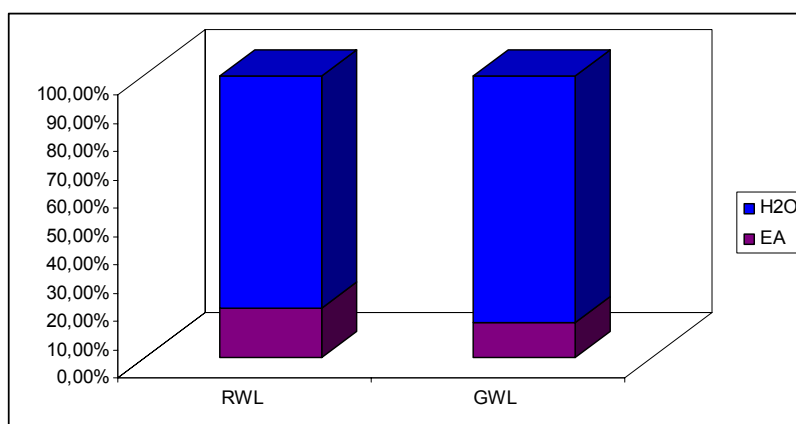
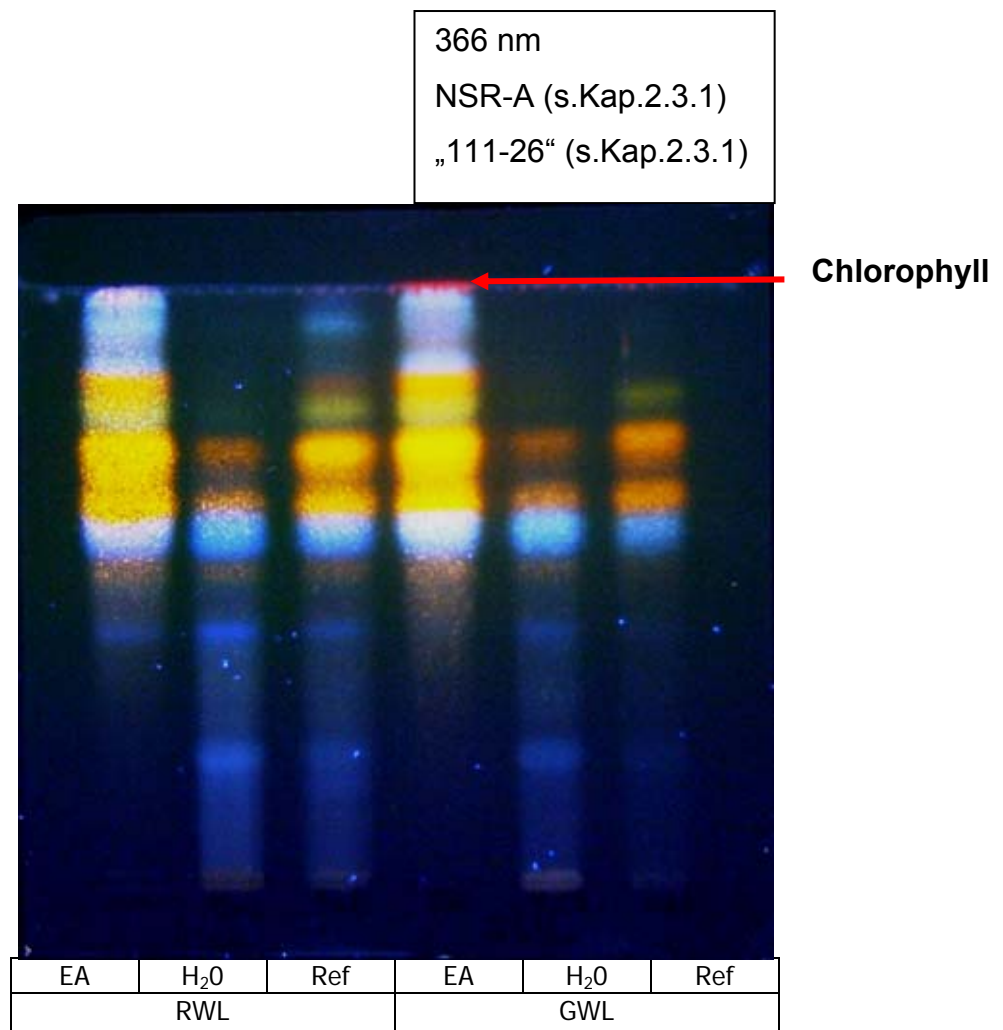


Abb. 32: Ausbeute der EA- und H<sub>2</sub>O-Fractionen des Weinlaubs (GWL und RWL)

#### 3.2.3.1 Dünnschichtchromatographische Vergleiche der Fraktionen

Nach der Herstellung der polaren und apolaren Phasen des Weinlaubs durch Ausschütteln mit H<sub>2</sub>O und EA, wurden jene unter Verwendung der Dünnschichtchromatographie charakterisiert. (s. Kap. 2.3.1). Zur dünnschichtchromatographischen Darstellung wurde eine DC-Platte zum Auftragen der Fraktionen, eine mobile Phase („111-26“) (s.Kap.2.3.1) und das Naturstoffreagenz-A zum Besprühen benötigt. Als Referenz wurden die jeweiligen

MeOH-Extrakte verwendet. Im Anschluss wurde bei 366nm detektiert. (s. Abb. 33)  
 Das Chromatogramm lässt erkennen, dass die Fraktionen des GWL und RWL ein nahezu einheitliches Inhaltsstoffmuster besitzen. Der alleinige Unterschied zwischen dem Weinlaub ist die in der EA-Fraktion des GWL vorhandene rosa Bande an der Fließmittelfront, die auf die Anwesenheit von Chlorophyll zurückzuführen ist. Die markanten orangen Zonierungen weisen auf die enthaltenen Flavonoide hin, blaue Banden sind ein Hinweis auf Phenolcarbonsäuren.



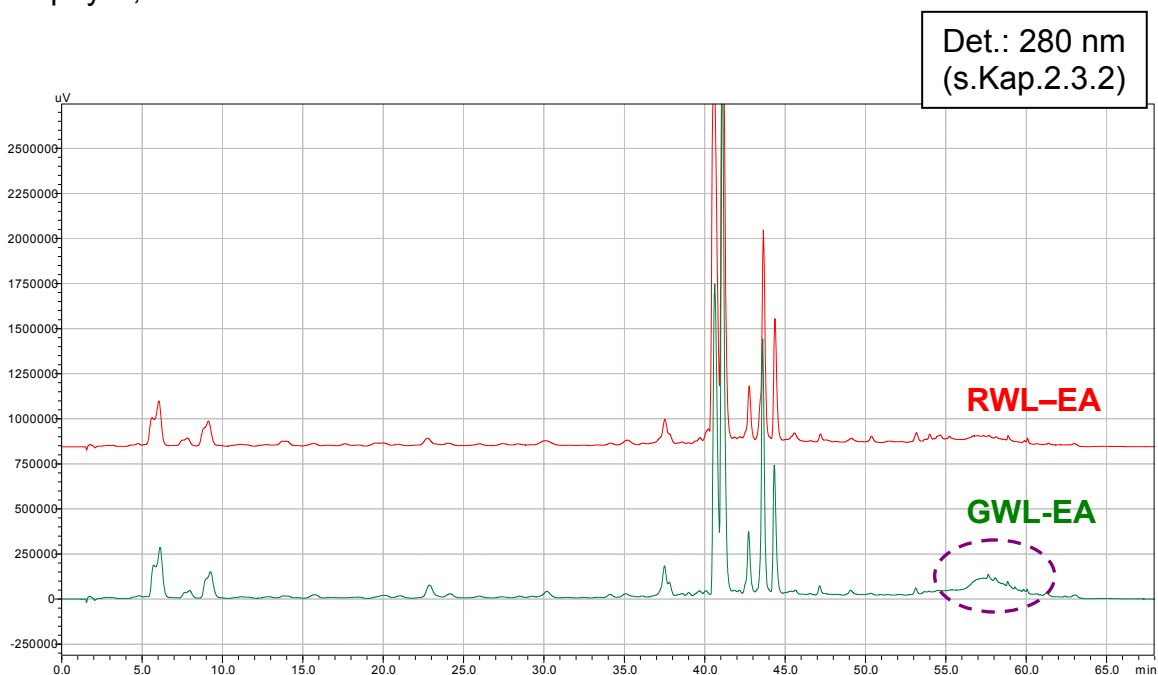
**Abb. 33: Dünnschichtchromatographischer Vergleich der EA- und H<sub>2</sub>O-Fractionen des G/RWL**

Eine Gegenüberstellung der EA- und H<sub>2</sub>O-Fraktion mit der entsprechenden MeOH-Fraktion macht deutlich, dass die Banden der polaren Inhaltsstoffe bis zu einem Rf-Wert=0,7 erkennbar sind, wohingegen die apolaren Substanzen ab einem Rf-Wert=0,6 auftreten. Außerdem ist zu erkennen, dass die Auftrennung

der Inhaltsstoffe nicht quantitativ ist, sondern dass die orangen Zonen der Flavonoide mehr (EA) oder weniger (H<sub>2</sub>O) angereichert sind.

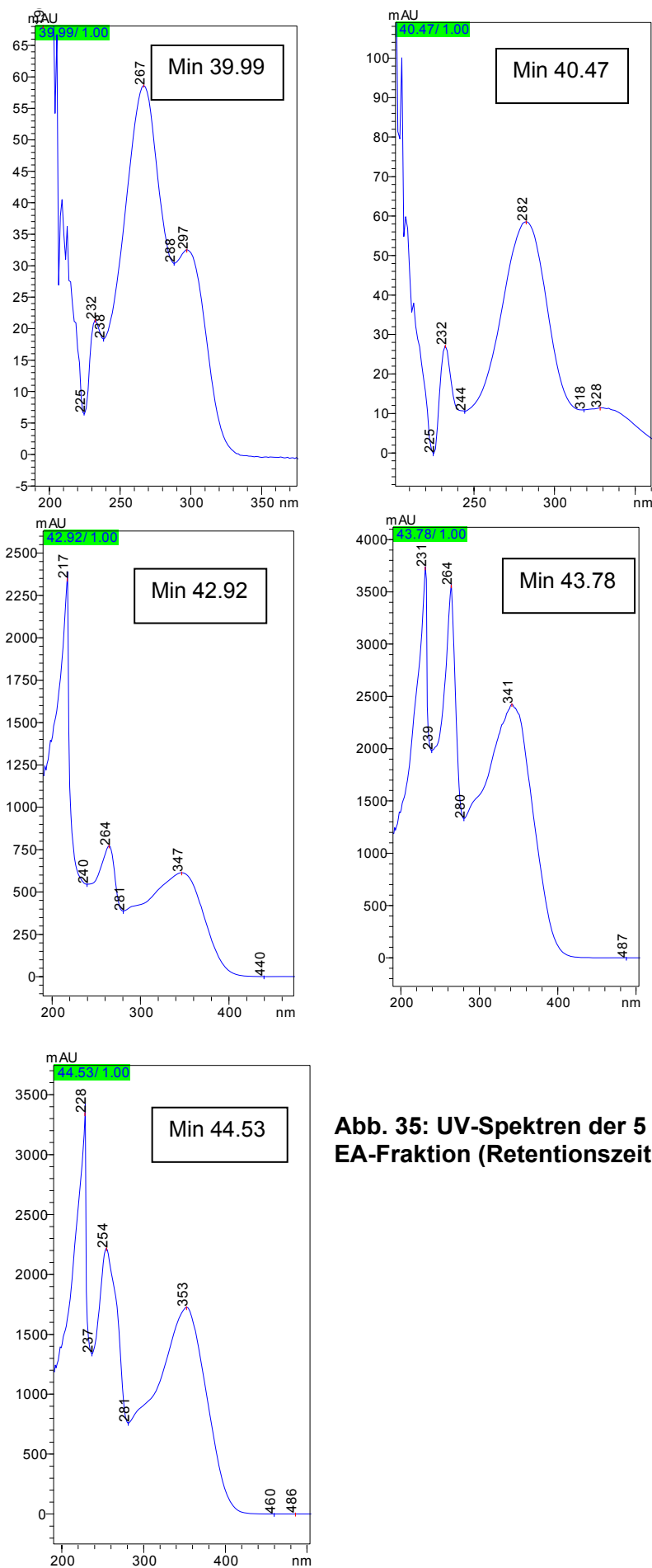
### 3.2.3.2 HPLC-Vergleiche der Fraktionen

Die EA- und H<sub>2</sub>O-Fractionen des Weinlaubs wurden im weiteren Verlauf mit Hilfe der HPLC (s. Kap. 2.3.2) charakterisiert und verglichen. Zunächst wurden die EA-Fractionen des GWL und RWL gegenüber gestellt, um die dünnschichtchromatographischen Ergebnisse zu konkretisieren. Das abgebildete Chromatogramm (s. Abb. 34) weist kaum qualitative Unterschiede zwischen den beiden Proben auf. Der Großteil der im R/GWL enthaltenen Inhaltsstoffe wird bei 280nm hauptsächlich bei einer Retentionszeit von Minute 40 bis 45 detektiert. Dabei handelt es sich um Flavonoide und Phenolcarbonsäuren. In der EA-Fraktion des GWL sieht man zusätzlich bei Min 55 bis 60 ein Peak vom Chlorophylls, das im RWL durch den Abbau nicht mehr vorhanden ist.



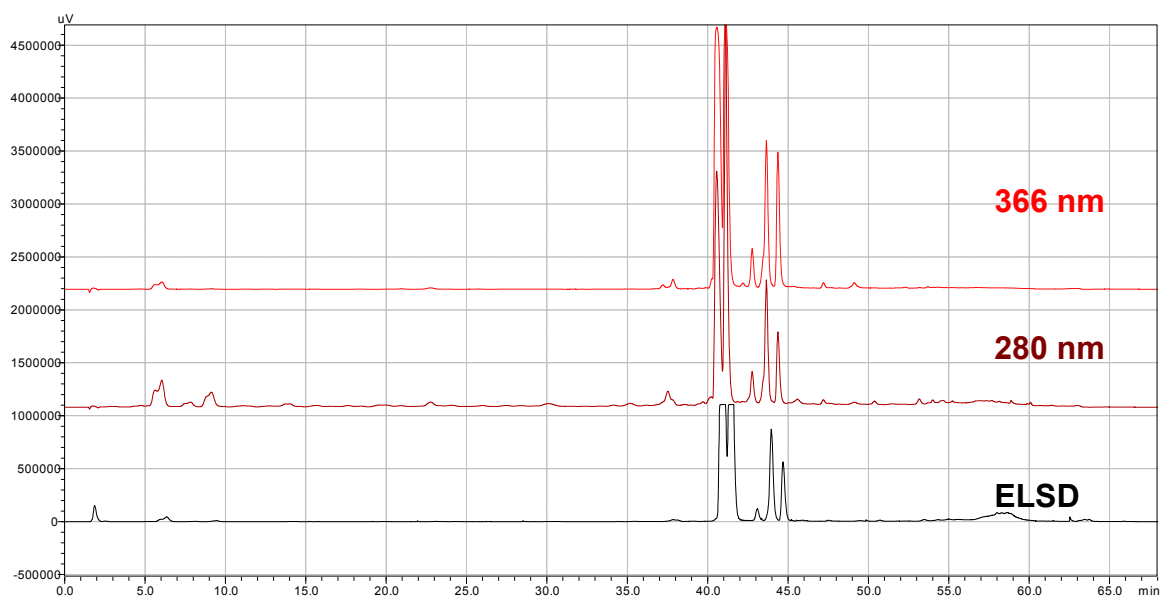
**Abb. 34: HPLC-Vergleich der EA-Fractionen des G/RWL**

Die UV-VIS-Spektren der fünf Hauptpeaks (Retentionszeit 40-45min) sind in Abb.35 dargestellt. Diese Spektren sind charakteristisch für die enthaltenen Flavonoide, da sie zwei Absorptionsmaxima bei 250-285nm und 320-385nm aufweisen. Zur Identifizierung dieser Substanzen kam die LC/MS (s. Kap. 3.2.3.2) zum Einsatz.

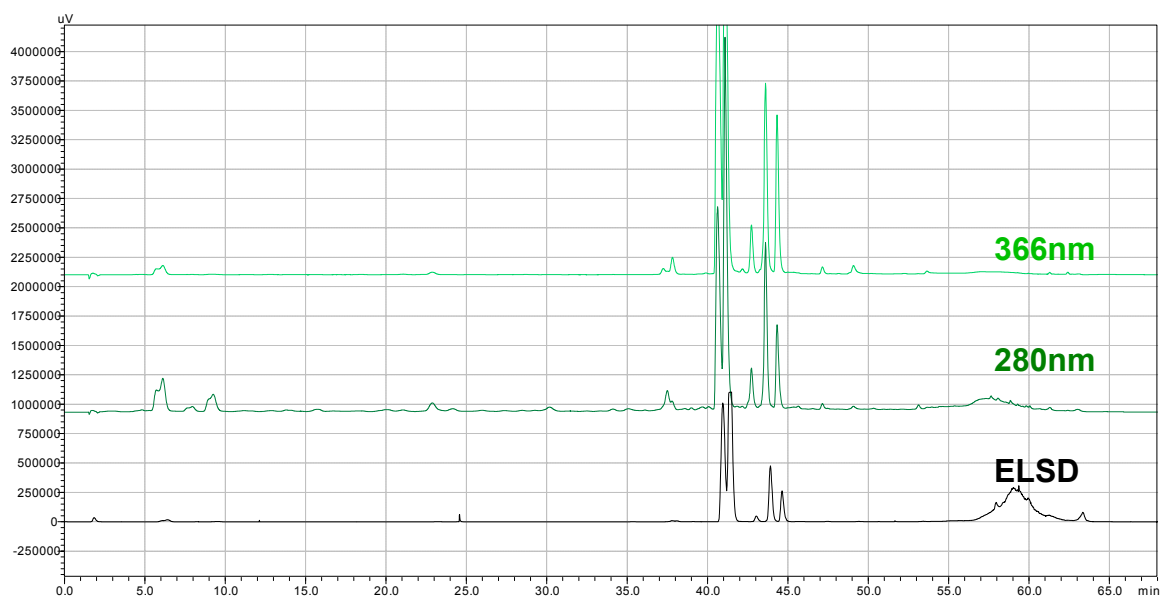


**Abb. 35: UV-Spektren der 5 Hauptpeaks der RWL-EA-Fraktion (Retentionszeit 40-45min)**

Zur Veranschaulichung der Selektivität der Detektoren, wurden die EA-Fractionen bei 280nm und 366nm und dem ELSD gegenübergestellt (s. Abb. 36, 37). Der Vergleich brachte die Erkenntnis, dass auch im Falle des Weinlaubs die Detektion bei 280nm am sinnvollsten erscheint, da 366nm ausschließlich für Flavonoide (Min 40 bis 45) selektiv ist, die jedoch bei 280nm ebenfalls angezeigt werden. Der Einsatz des ELSD wäre bei quantitativen Vergleichen innerhalb der Proben zu bevorzugen.



**Abb. 36: HPLC-Vergleich der EA-Fraktion des RWL bei 280nm, 366nm und mit ELSD**



**Abb. 37: HPLC-Vergleich der EA-Fraktion des GWL bei 280nm, 366nm und mit ELSD**

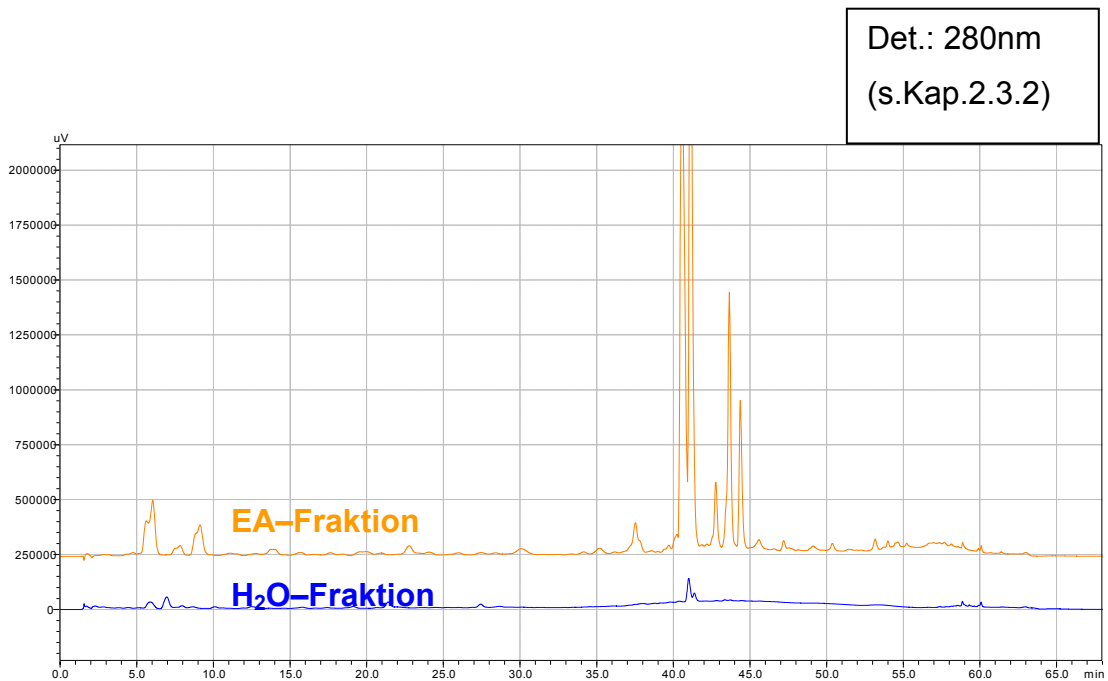


Abb. 38: HPLC-Vergleich der EA- und H<sub>2</sub>O-Fraktion des RWL bei 280nm

Der Vergleich der EA- und H<sub>2</sub>O-Fraktion des RWL bei 280nm (s. Abb. 38) zeigt, dass ein Großteil der Inhaltsstoffe in der EA-Fraktion angereichert ist. Die enthaltenen Flavonoide bei Minute 40-45 sind in der H<sub>2</sub>O-Fraktion kaum ersichtlich.

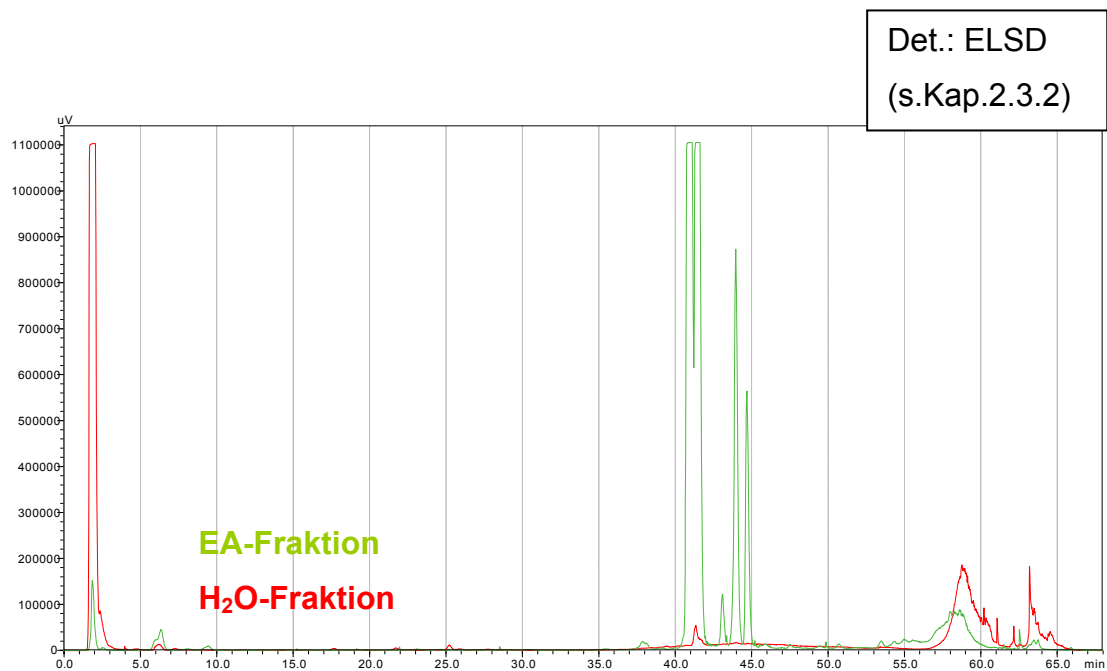


Abb. 39: HPLC-Vergleich der EA- und H<sub>2</sub>O-Fraktion des RWL mit ELSD

Die quantitative Gegenüberstellung der EA- und H<sub>2</sub>O-Fraktion des RWL (s. Abb. 39) mit dem ELSD zeigt ebenfalls, dass trotz größerer Ausbeute der H<sub>2</sub>O-Fraktion der Hauptanteil der Flavonoide bzw. Phenole in der EA-Phase angereicht ist. In der H<sub>2</sub>O-Fraktion tritt bei Minute 2 ein markanter Peak auf, bei dem man aufgrund der Retentionszeit auf polare Substanzen (z.B. Zucker) (s. Abb. 39) schließen kann.

### 3.2.3.3 Bioassay-Ergebnisse

Aufgrund der Tatsache, dass sich zwischen dem RWL und GWL keine signifikanten Unterschiede erkennen ließen (s. Kap. 3.2.3.1, 3.2.3.2), wurden die weiteren Analysen lediglich mit den Fraktionen des RWL durchgeführt.

Im Bioassay auf die eNOS-Aktivität erwies sich die EA-Fraktion des RWL nach zwei durchgeführten Versuchen deutlich wirksamer als die H<sub>2</sub>O-Fraktion. (s. Abb. 40). Die apolare und polare Fraktion wurden in unterschiedlichen Konzentrationen getestet, da die H<sub>2</sub>O-Fraktion bei 300µg/ml eine negative Wirkung auf die Zellviabilität hatte.

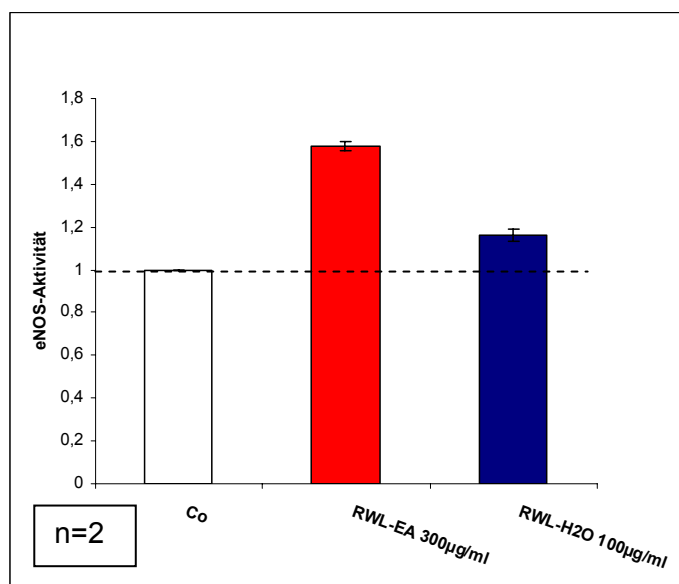


Abb. 40: Bioassay-Ergebnisse der EA- und H<sub>2</sub>O-Fractionen des RWL



### 3.2.3.4 Western Blot-Ergebnisse

Die EA- und H<sub>2</sub>O-Fractionen des RWL wurden analog zu den Traubenbestandteilen (s. Kap. 3.1.3.3) auf eine gesteigerte Proteinexpression der eNOS untersucht.

Anhand der Tab. 22 und der Abb. 42 lässt sich erkennen, dass weder die apolare, noch die polare RWL-Fraktion einen positiven Effekt bezüglich der Proteinexpression bewirkt. Eine Konzentrationserhöhung der EA-Fraktion von 100µg/ml auf 300µg/ml brachte keine Änderung mit sich.

Name	eNOS	alpha-Tub	eNOS/alpha Tub	Norm auf Co
<b>Kontrolle</b>	3950333	3114369	1,143649103	<b>1</b>
<b>RWL-EA 100µg</b>	1843511	3785145	0,487038409	<b>0,43</b>
<b>RWL-EA 300µg</b>	2405669	4501812	0,534377935	<b>0,47</b>
<b>RWL-H2O 300µg</b>	3075055	4327647	0,710560496	<b>0,62</b>
<b>Rosm.säure</b>	2472256	4215825	0,586422824	<b>0,51</b>

Tab. 22: Western-Blot-Ergebnisse der EA- und H<sub>2</sub>O-Fractionen des RWL in Bezug auf eine gesteigerte eNOS-Proteinexpression

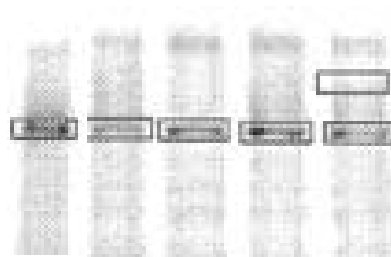


Abb. 41: Darstellung der eNOS-Bande bei 133kDA

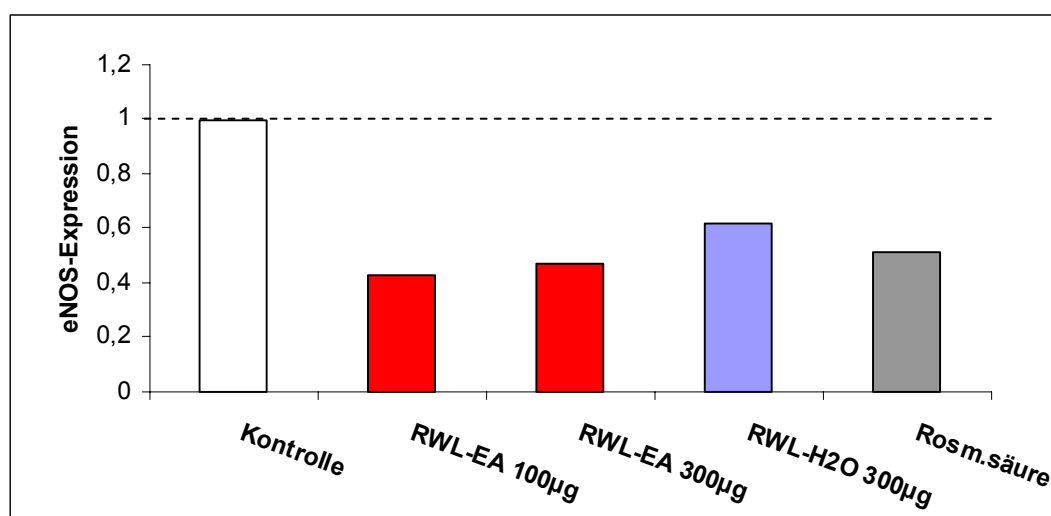
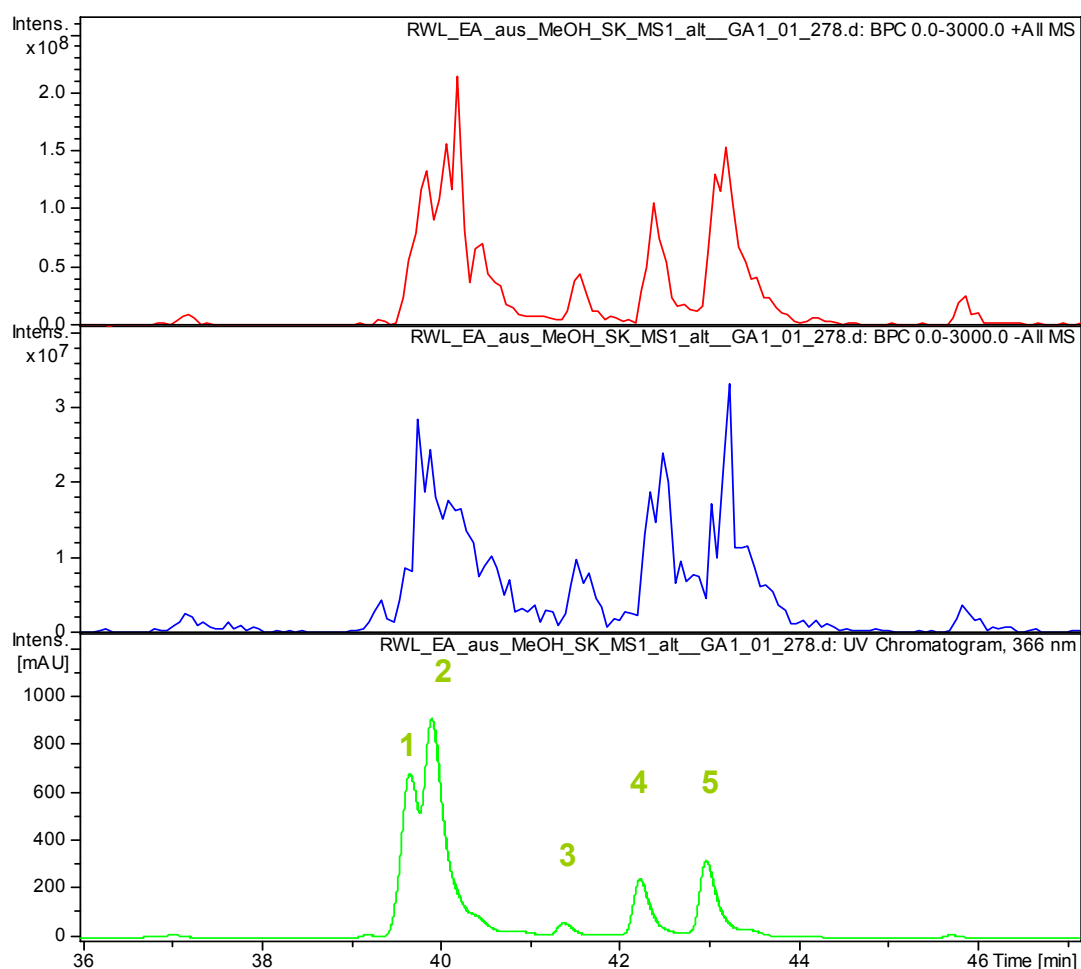


Abb. 42: Western-Blot-Ergebnisse der EA- und H<sub>2</sub>O-Fractionen des RWL in Bezug auf eine gesteigerte eNOS-Proteinexpression

### 3.2.3.5. LC-MS Analyse

Zur Charakterisierung des komplexen Substanzengemisches in der RWL-EA-Fraktion, kam die LC-MS zum Einsatz. (s. Kap. 2.3.4)

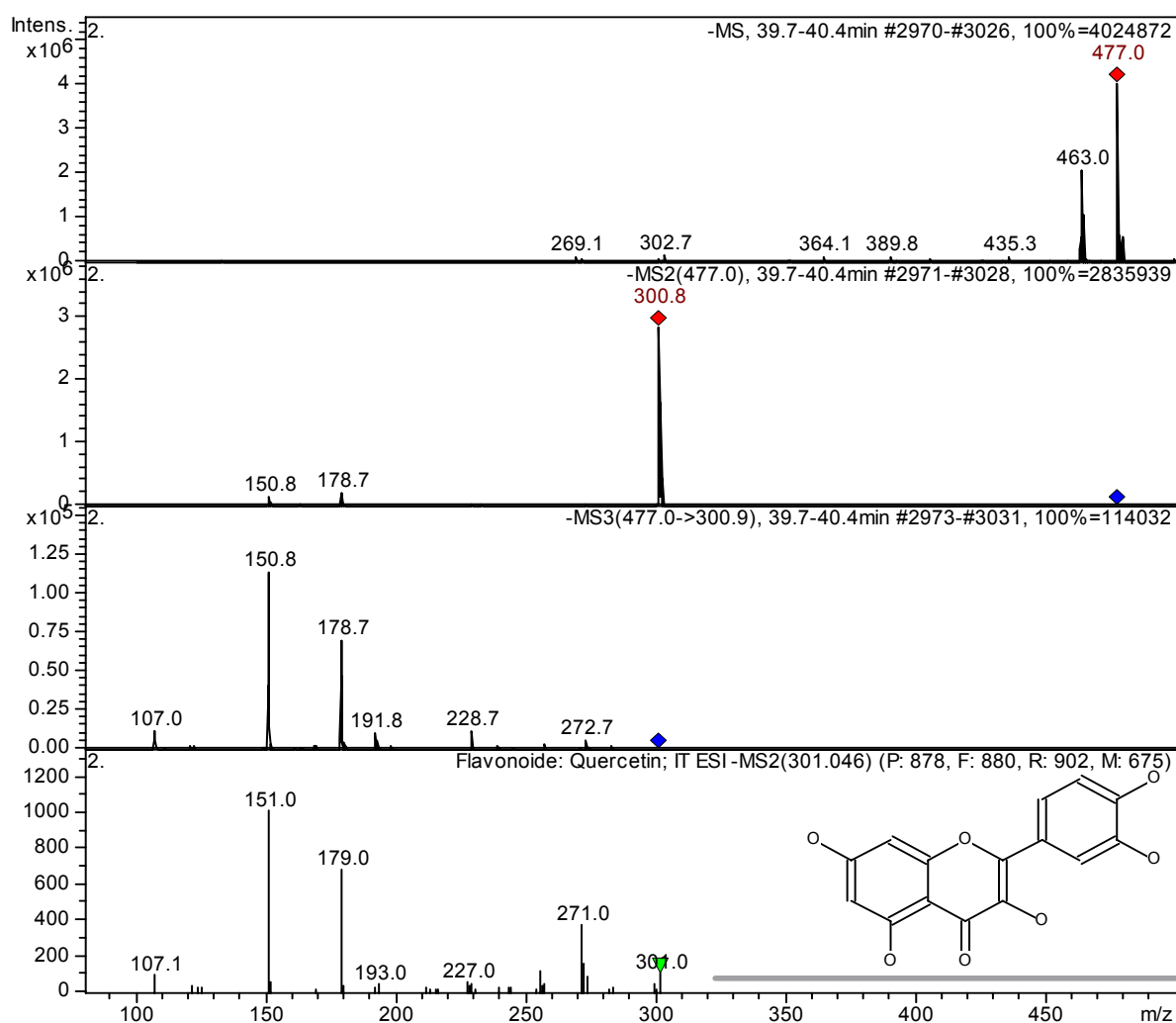
Zunächst konnten mit Hilfe des Diodenarray-Detektor bei 366nm fünf Hauptpeaks bzw. Hauptkomponenten identifiziert werden (s. Abb. 43), die im weiteren Schritt nach ihrer Masse und Ladung aufgetrennt und in einem Massenspektrum dargestellt (ESI-MS) wurden (s. Abb. 44-48). Diese 5 Hauptinhaltsstoffe werden in Folge genauer diskutiert. Bei diesem Verfahren wurde eine Ionenfalle verwendet und für die qualitative Analyse eine Fragmentierung bis  $MS^3$  vorgenommen. Die erhaltenen Fragmentierungsmuster wurden mit der vorhandenen Datenbank verglichen<sup>23</sup>. Die „Matches“ werden anhand ihrer P- und F-Wert charakterisiert. Ein Wert von über 900 weist auf einen guten Treffer hin.



**Abb. 43: Ausschnitt der relevanten Peaks der Fraktion RWL-EA bei 366nm**

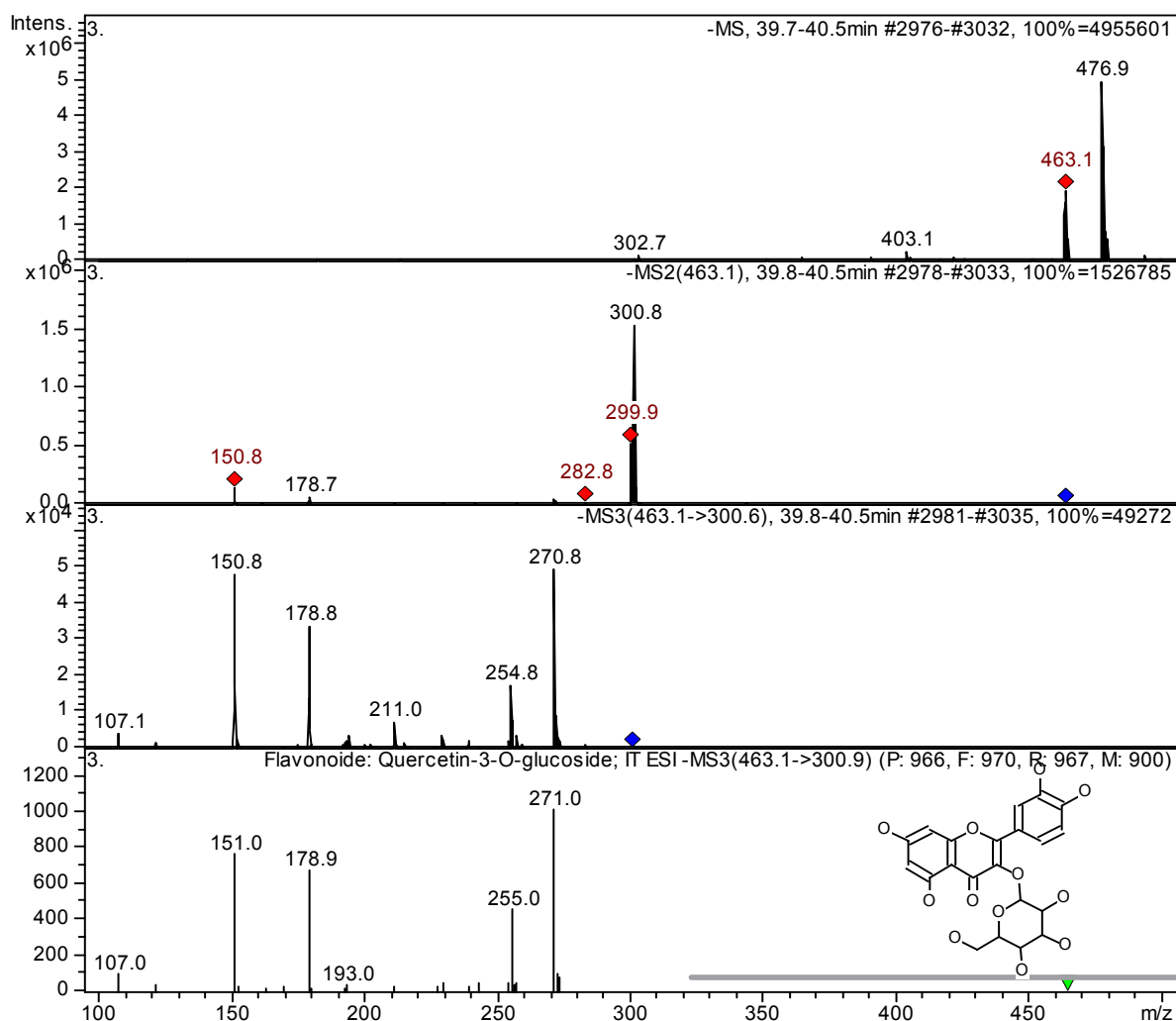
<sup>23</sup> Burgert M.

Peak 1 (s. Abb. 43) tritt bei Minute 39,6 auf. Dieses Retentionsfenster ist charakteristisch für Hexoside, jedoch kann mit der Methode keine Unterscheidung von Isomeren (z.B. Glucose, Galaktose) gemacht werden. In Abb. 44 zeigt sich ein intensiver Peak mit  $m/z$  477.0, der als Precursor-Ion in der Ionenfalle fragmentiert wird und somit weitere Produkt-Ionen erzeugt werden. Das Produkt-Ion mit  $m/z$  300.8 wird erneut einem Fragmentierungsschritt unterzogen und der erhaltene Fingerprint im  $MS^3$  wird mit der MS-Datenbank verglichen. Man erhält schließlich einen guten Matching-Wert (P- und F-Wert) für Quercetin(-Glucuronid).



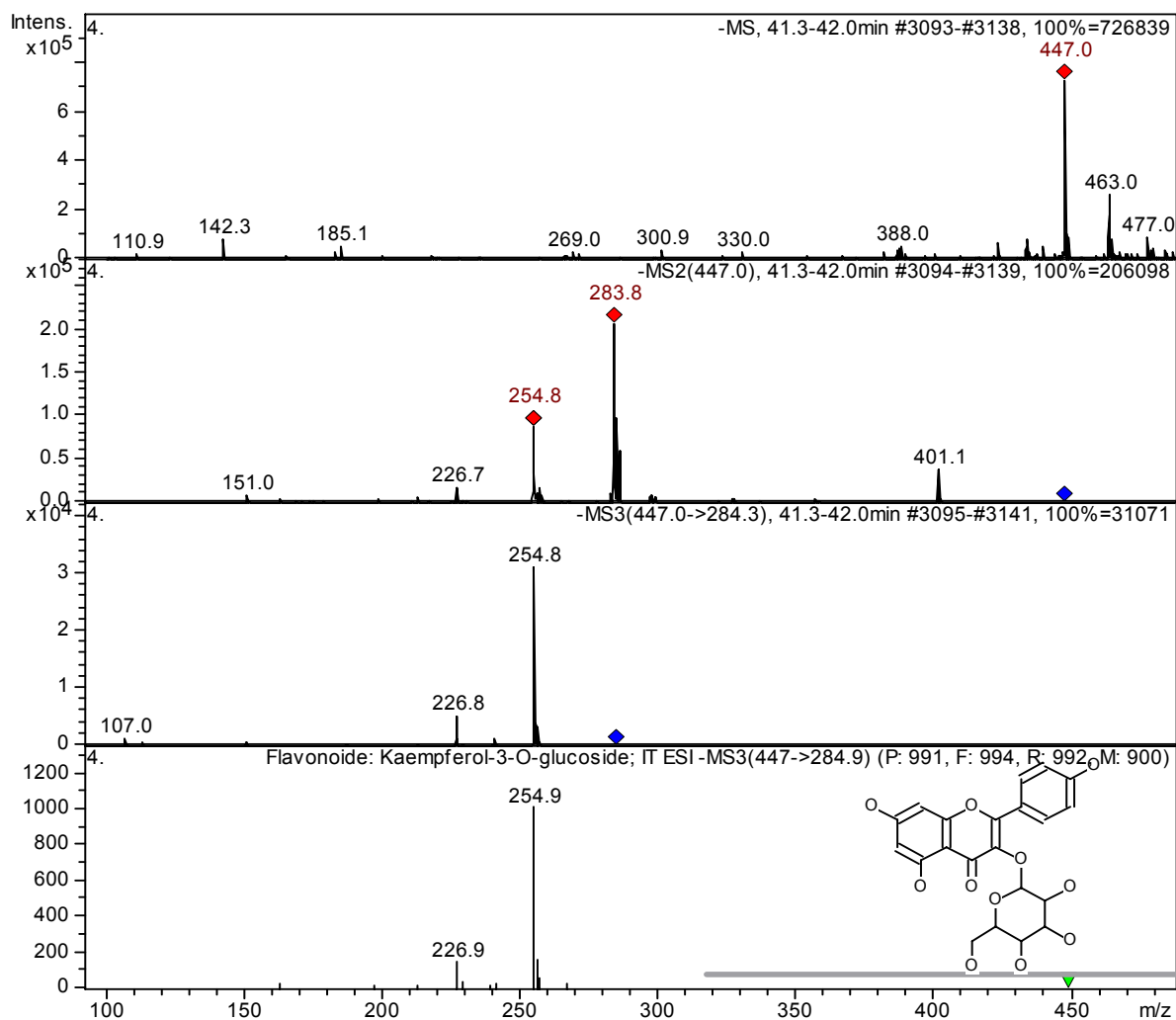
**Abb. 44: ESI- $MS^3$  Spektrogramm des Peak 1 (Retentionszeit 39,6) der RWL-EA im Negativ-Modus**

Im UV-Spektrum tritt bei einer Retentionszeit von Minute 39.7-40.5 die Hauptkomponente 2 auf (s. Abb. 43). Im Massenspektrum zeigen sich zwei intensive Peaks mit  $m/z$  463.1 und 476.9 (s. Abb. 45). Als Precursor-Ion wird der Peak mit  $m/z$  463.1 verwendet und das somit entstandene Produkt-Ion ( $m/z$  299.9) ist möglicherweise auf ein Aglykon zurückzuführen, da die Abspaltung von  $m/z$  163 für eine Hexose charakteristisch ist. Das Fragmentierungsmuster im  $MS^3$  zeigt einen guten Match mit einem Quercetin-Derivat.



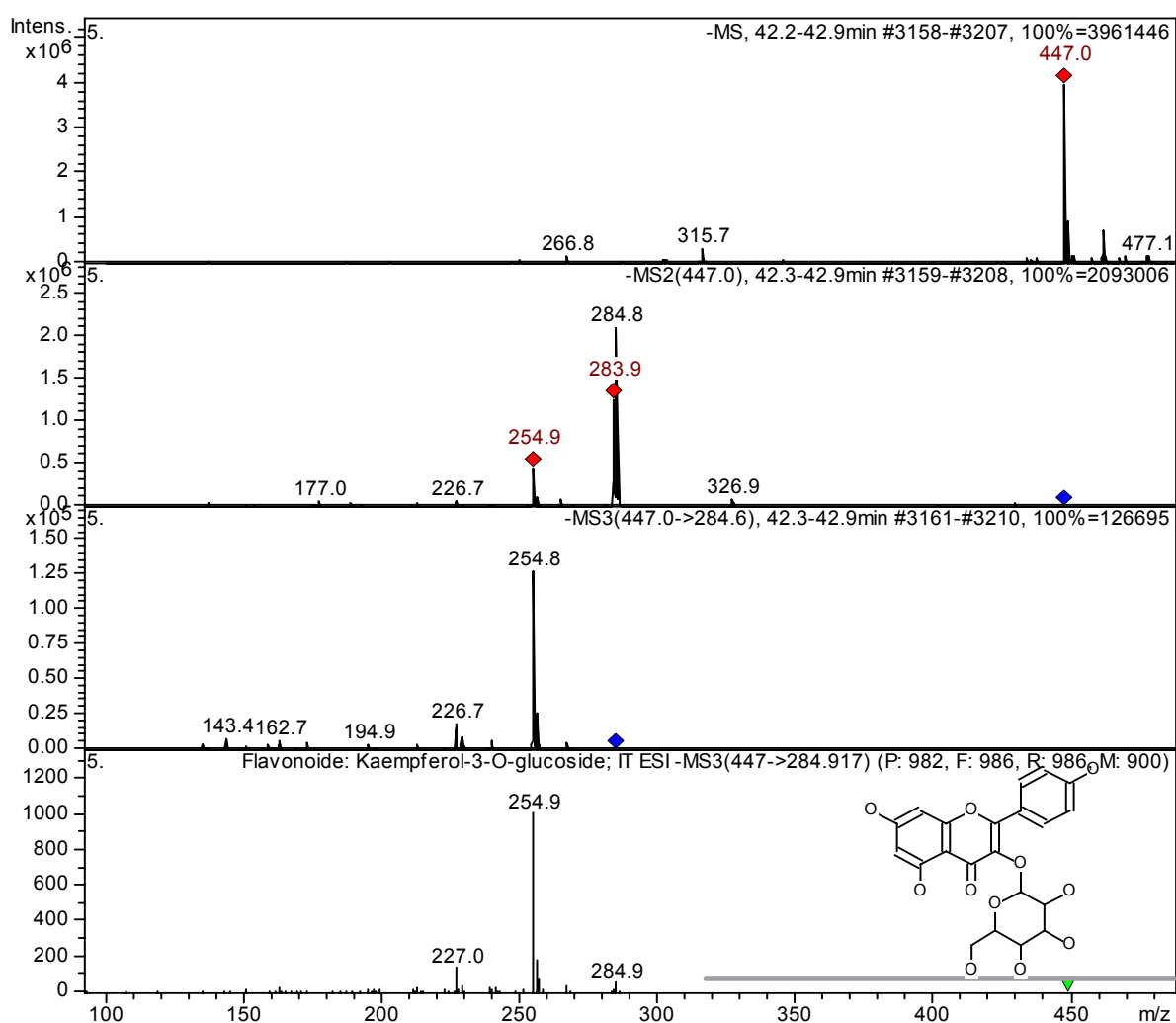
**Abb. 45:** ESI- $MS^3$  Spektrogramm des Peak 3 (Retentionszeit 39,7) der RWL-EA im Negativ-Modus

Im Falle des Hauptpeaks 3 (Minute 41.3-42.0) (s. Abb. 43) gibt es mit MS-Datenbank einen Match mit einem Kämpferol-Derivat. Im dargestellten Negativ-Modus in Abb. 46 tritt jedoch ein Radikalion auf, das instabil ist.



**Abb. 46: ESI-MS<sup>3</sup> Spektrogramm des Peak 1 (Retentionszeit 41,3) der RWL-EA im Negativ-Modus**

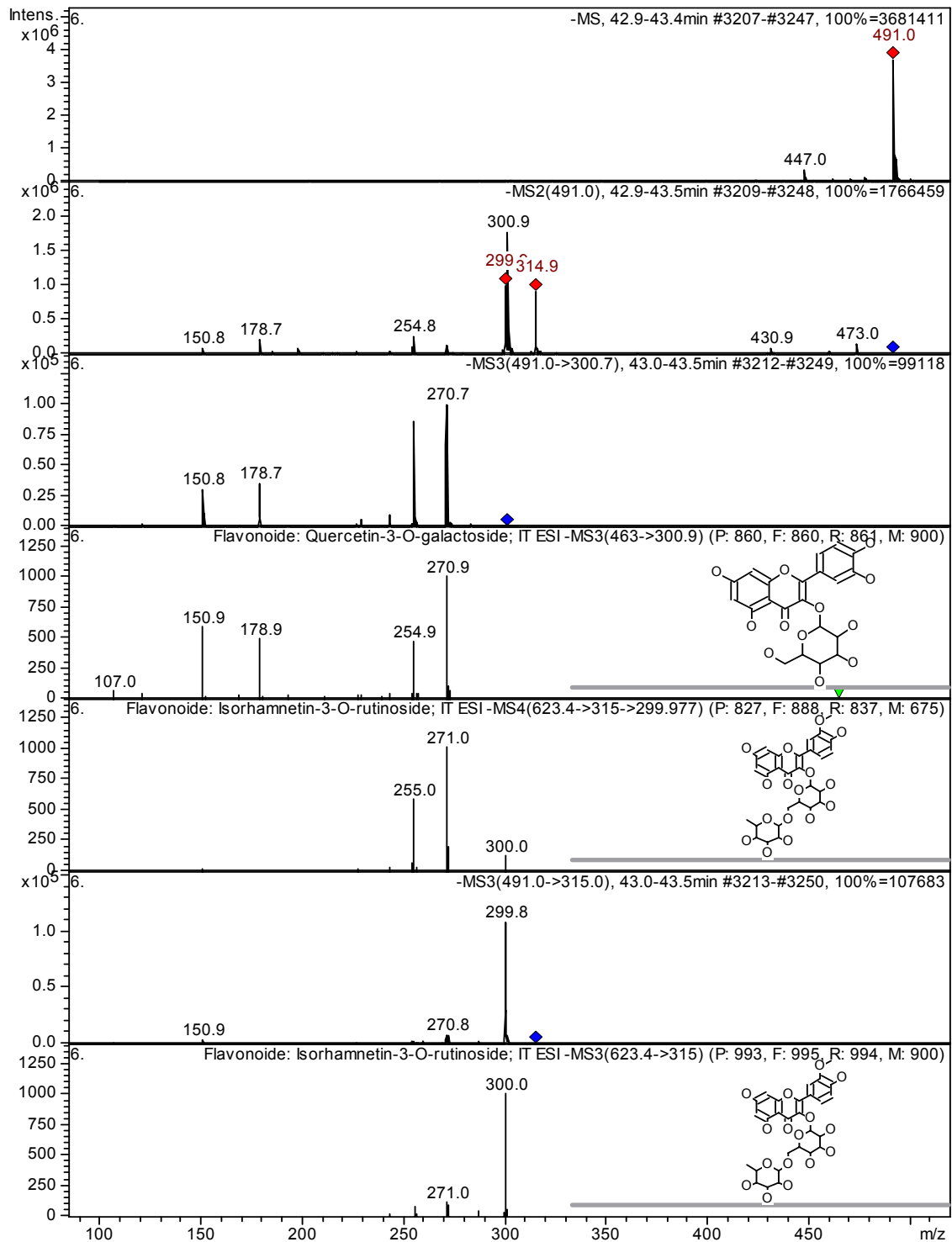
Das Massenspektrum des 4. Hauptpeaks (Retentionszeit von Minute 42.2-42.9) (s. Abb. 43) weist, wie die Hauptkomponente 3 (s. Abb. 47), einen intensiven Peak mit  $m/z$  447.0 auf. Jedoch handelt es sich dabei womöglich, aufgrund eines anderen Fragmentierungsmusters, um ein Kämpferol-Derivat mit anderem Zucker (z.B. Galaktose) bzw. einer anderen Verknüpfung (z.B. 7-O-, 4'-O-).



**Abb. 47: ESI-MS<sup>3</sup> Spektrogramm des Peak 1 (Retentionszeit 42,2) der RWL-EA im Negativ-Modus**

Im Chromatogramm (s. Abb. 43) tritt bei Minute 42.9-43.4 der Hauptpeak 5 auf, der im Abgleich mit MS-Daten auf ein Quercetin-Derivat hinweist. Das Massenspektrum in Abb. 48 zeigt 2 intensive Peaks, die ineinander übergehen.

Anhand der Fragmentierung lässt sich durch  $m/z$  15 auf eine Methylgruppe schließen und somit liegt möglicherweise ein methyliertes Quercetin vor.



**Abb. 48: ESI-MS<sup>3</sup> Spektrogramm des Peak 1 (Retentionszeit 42,9) der RWL-EA im Negativ-Modus**

### 3.2.4 Analyse der RWL-Ethylacetat-Subfraktionen

Des Weiteren wurde die zellaktive RWL-EA-Fraktion herangezogen und mit Hilfe der Gelchromatographie (s. Kap. 2.3.3) in Subfraktionen fraktioniert. Diese Methode wurde nach dem gleichen Verfahren wie jenem der Traubenbestandteile durchgeführt. (s. Kap. 3.1.4) Die Einwaage und Ausbeuten der RWL-EA-Subfraktionen sind aus Tab. 23 und Tab. 24 zu entnehmen. Die Subfraktionen 1-3 stellten den Vorlauf dar und wurden nicht weiters analysiert. Die höchsten Ausbeuten zeigten sich in Subfraktion 30, 31 und 32 (s.Tab.24)

Einwaage	389,82mg
Absolute Ausbeute	367,77mg

**Tab. 23 Einwaage und absolute Ausbeute der SCH-MeOH-Subfraktionen**

<b>Subfraktion</b>	<b>Absolute Ausbeute (mg)</b>	<b>Relative Ausbeute</b>
4	0,88	0,24%
5	1,55	0,42%
6	0,72	0,20%
7	5,08	1,38%
8	4,52	1,23%
9	4,66	1,27%
10	7,95	2,16%
11	11,05	3,00%
12	16,3	4,43%
13	14,1	3,83%
14	15,11	4,11%
15	13,62	3,70%
16	15,99	4,35%
17	17,1	4,65%
18	16,92	4,60%
19	11,35	3,09%
20	6,8	1,85%
21	5,48	1,49%
22	5,23	1,42%
23	5,99	1,63%
24	8,07	2,19%
25	5,25	1,43%



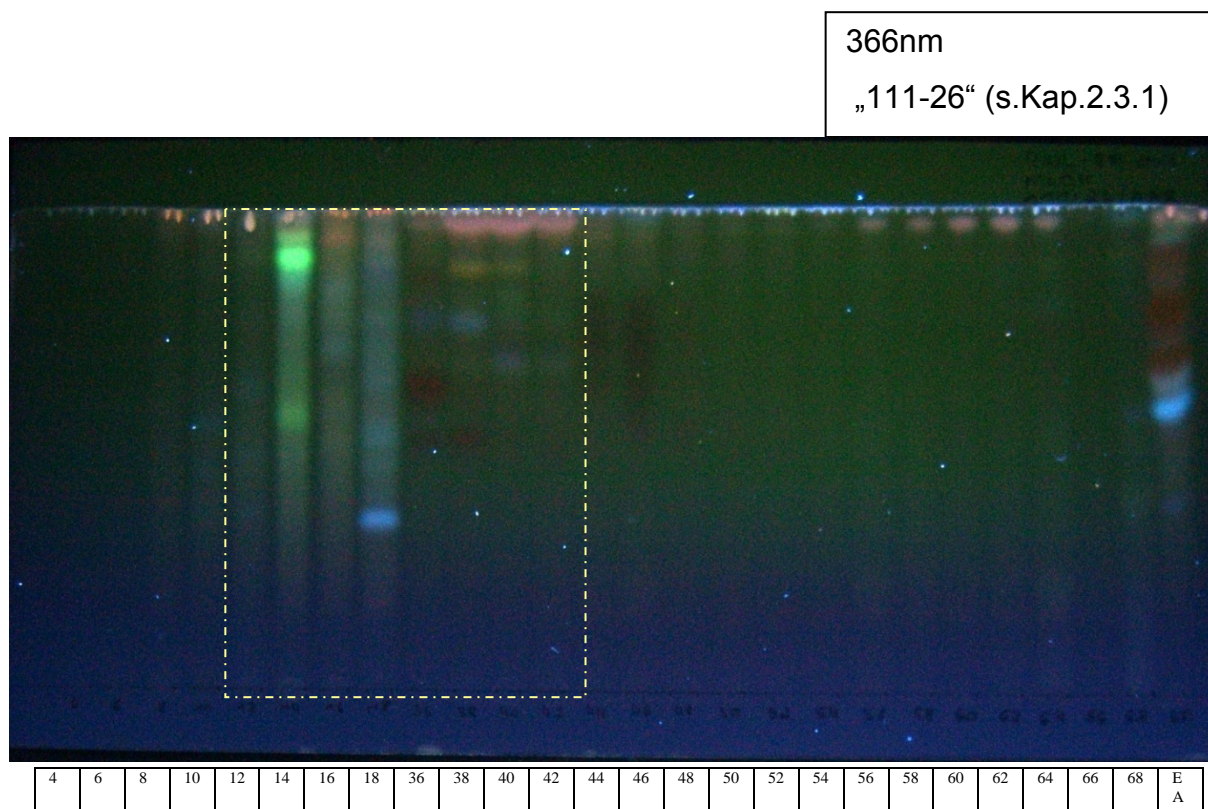
26	4,1	1,11%
27	6,5	1,77%
28	10,4	2,83%
29	11,21	3,05%
30	24,37	6,63%
31	25,58	6,96%
32	21,51	5,85%
33	18,25	4,96%
34	1,16	0,32%
35	10,8	1,21%
36	4,45	0,75%
37	2,77	0,42%
38	1,54	0,41%
39	1,5	0,42%
40	1,56	0,39%
41	1,42	0,34%
42	1,26	0,31%
43	1,15	0,52%
44	1,9	0,28%
45	1,02	0,33%
46	1,21	0,35%
47	1,28	0,43%
48	1,58	0,25%
49	0,91	0,35%
50	1,28	0,28%
51	0,83	0,23%
52	0,95	0,26%
53	1,09	0,30%
54	0,75	1,20%
55	0,72	0,20%
56	0,71	0,19%
57	0,82	0,22%
58	0,66	0,18%
59	0,76	0,21%
60	0,6	0,16%
61	0,94	0,26%
62	1,21	0,33%
63	0,67	0,18%
64	1,38	0,38%
65	0,87	0,24%
66	0,68	0,18%
67	0,68	0,18%
68	1,16	0,32%
68	1,16	0,32%

Tab. 24: Absolute und relative Ausbeuten der RWL-EA-Subfraktionen

### 3.2.4.1 Dünnschichtchromatographische Charakterisierung der Subfraktionen

Die Fraktionierung der RWL-EA-Fraktion wurde mit der Dünnschichtchromatographie auf die Trennleistung untersucht. Es wurde eine große Bandbreite der Subfraktionen für diese Methode herangezogen, um eine möglichst gute Charakterisierung der Auftrennung zu erhalten.

Das Chromatogramm in Abb. 49 zeigt, dass möglicherweise der Großteil der Inhaltsstoffe in den Subfraktionen 10-40 vorhanden ist. Dies korreliert ebenfalls mit den erhaltenen Ausbeuten. Daher wurden auch diese Subfraktionen in weiteren dünnschichtchromatographischen Verfahren untersucht.



**Abb. 49 Dünnschichtchromatographischer Vergleich der RWL-EA-Subfraktionen**

Im Vergleich zu den Referenzen (RWL-EA und RWL-MeOH) lässt sich eine gute Trennung der Inhaltsstoffe in den Subfraktionen erkennen (s. Abb. 49). Die in Subfraktion 36 und 38 auftretenden roten Banden weisen auf die enthaltenen Anthocyane hin. In Subfraktion 18 tritt eine markante blaue Zonierung der Polyphenolsäuren auf.

In den beiden nachfolgenden Chromatogrammen (s. Abb. 50, 51) wurde der Schwerpunkt auf die Subfraktionen 20 bis 35 gelegt. In Abb. 50 zeigen sich auffallende blaue Banden (Rf-Wert=0,2) in Subfraktionen 22 bis 25, wobei die Fraktion 22 eine weitere blaue Zonierung bei einem Rf-Wert=0,6 aufweist. Die Subfraktionen 26 bis 35 weisen sechs unterschiedliche orange Banden auf, die die enthaltenen Flavonoide darstellen. Für weitere Untersuchungen wurden Subfraktionen gewählt, in denen möglichst alle sichtbaren Zonierungen vorhanden sind. Subfraktion 24 wurde aufgrund der blauen Zonen (Rf-Wert=0,2), und 22 aufgrund der zusätzlichen blauen Bande bei einem Rf-Wert=0,6 gewählt. Im Falle der orangen Zone (Rf-Wert=0,7) fiel die Wahl auf die Subfraktion 27. Bezüglich der weiteren fünf orangen Zonierungen (Rf-Wert=0,3; 0,4; 0,5; 0,55; 0,62) wurde Fraktion 30 und 32 verwendet, jedoch ist die Bande bei Rf-Wert=0,62 in Subfraktion 32 nicht vorhanden. Weiters wurde Subfraktion 35 für folgende Analysen herangezogen, da aufgrund der einzigen ersichtlichen Zonierung (Rf-Wert=0,2) möglicherweise auf die Substanz geschlossen werden kann.

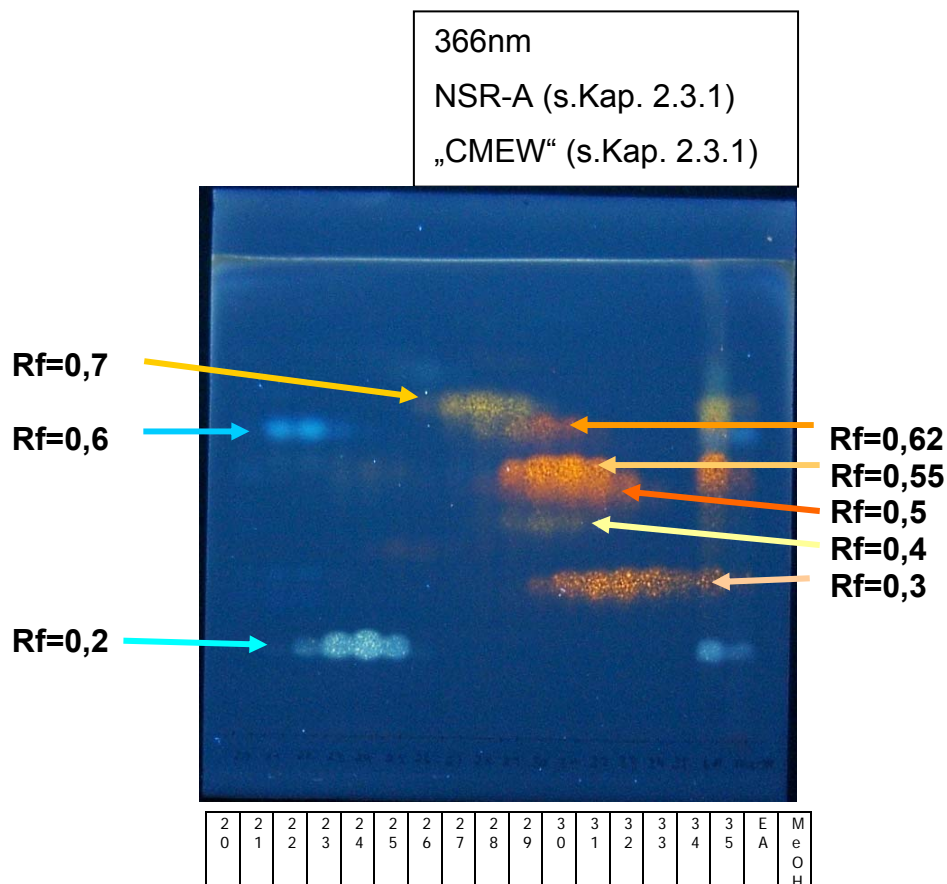
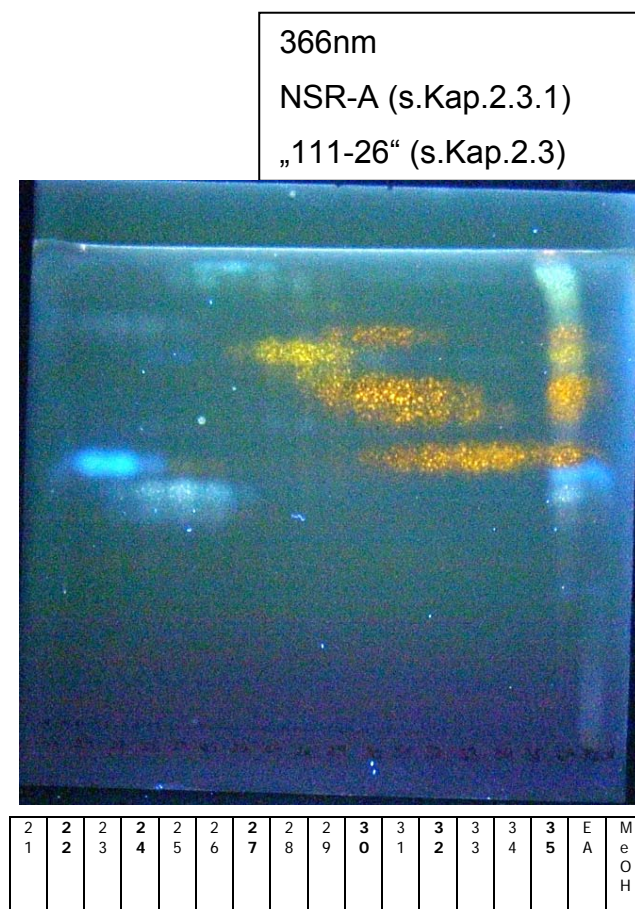


Abb. 50: Dünnschichtchromatographischer Vergleich der RWL-EA-Subfraktionen



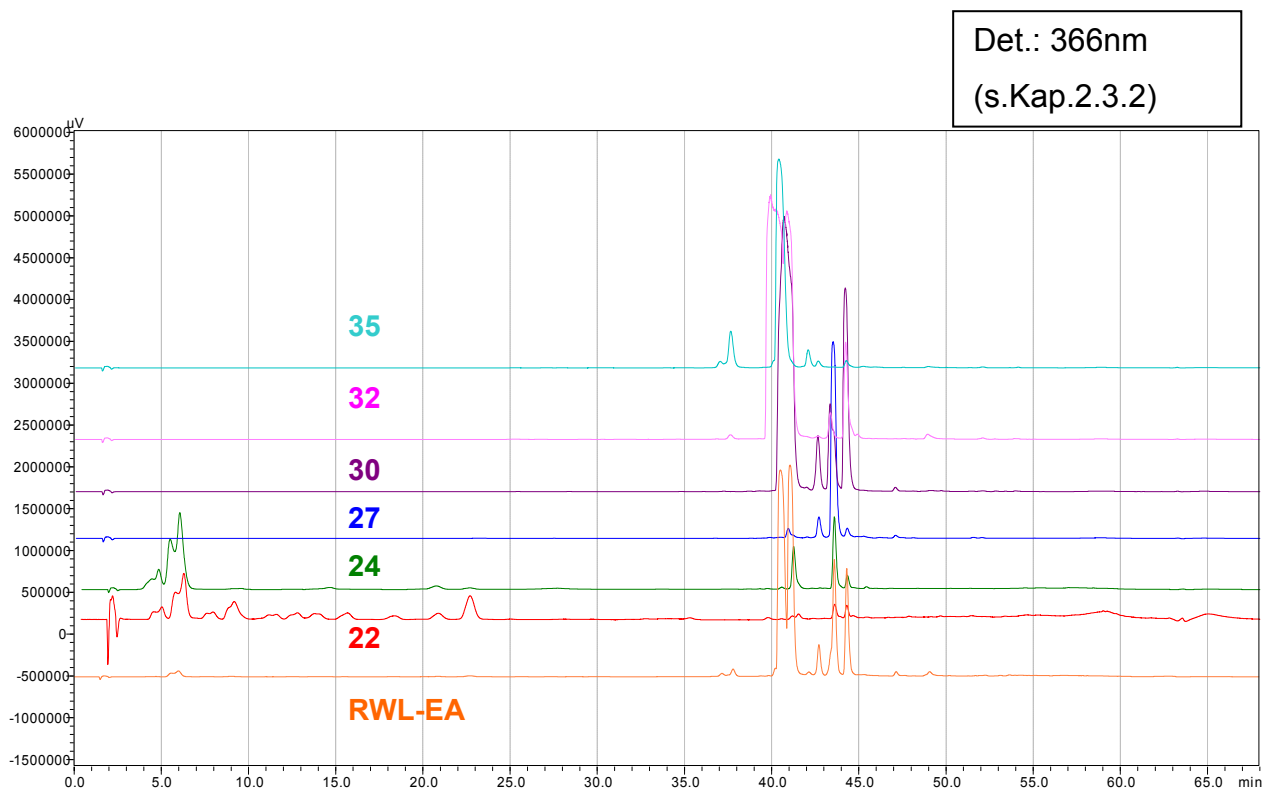
**Abb. 51: Dünnschichtchromatographischer Vergleich der RWL-EA-Subfraktionen**

### 3.2.4.2 Gegenüberstellung DC mit HPLC in Hinblick auf HPLC-Vergleiche der RWL-EA-Subfraktionen

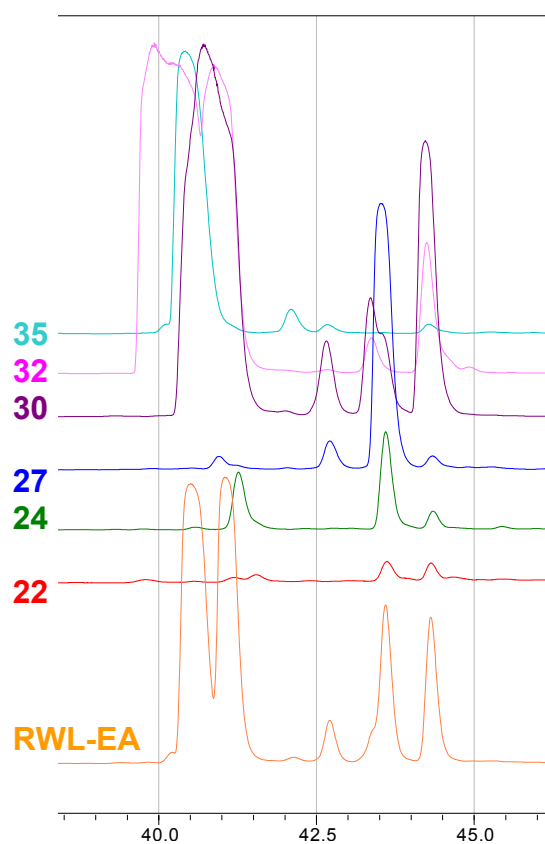
Die RWL-EA-Subfraktionen wurden weiters mit der HPLC analysiert und mit den Ergebnissen des Dünnschichtchromatogramms verglichen (s. Kap. 3.2.4.1).

In Abb. 52 zeigt sich, dass es zwischen den Subfraktionen etliche Übereinstimmung gibt. Bei Minute 4-6,5 weisen die Subfraktionen 22 und 24 zwei identische Doppelpeaks auf, die möglicherweise mit den blauen Zonierungen in der Dünnschichtchromatographie (s. Kap. 3.2.4.1) in Verbindung gebracht werden können. Der Bereich von Minute 36-46 wird in Abbildung 53 vergrößert dargestellt, um einen besseren Vergleich anstellen zu können. Dabei handelt es um die enthaltenen Flavonoide. In Subfraktion 32 zeigt sich in Minute 39-43 ein intensiver

Doppelpeak, der komplementär zu jenem in der RWL-EA-Fraktion ist. Der erste Peak tritt in Subfraktion 35 auf. Die Subfraktion 30 und 24 weisen den zweiten Peak des Doppelpeaks auf. Bei einer Retentionszeit von 42,5-43,0 min zeigt sich in Subfraktion 30 ein weiterer intensiver Peak, der ebenfalls in Subfraktion 27 und 35 vorhanden ist. Die Subfraktion 22, 27, 30 und 32 gleichen sich in dem Peak bei Minute 43,5. Weiters gibt es Übereinstimmungen zwischen den Fraktionen 30 und 32 bei einem Peak (Minute 44). Die in der Dünnschichtchromatographie (s. Kap. 3.2.4.1) auftretenden orangen bzw. gelben Zonierungen sind möglicherweise den Peaks ab Minute 39 des HPLC-Chromatogramms zuzuordnen, jedoch ist eine genaue Identifizierung nicht möglich.



**Abb. 52: HPLC-Vergleich der RWL-EA-Subfraktionen**

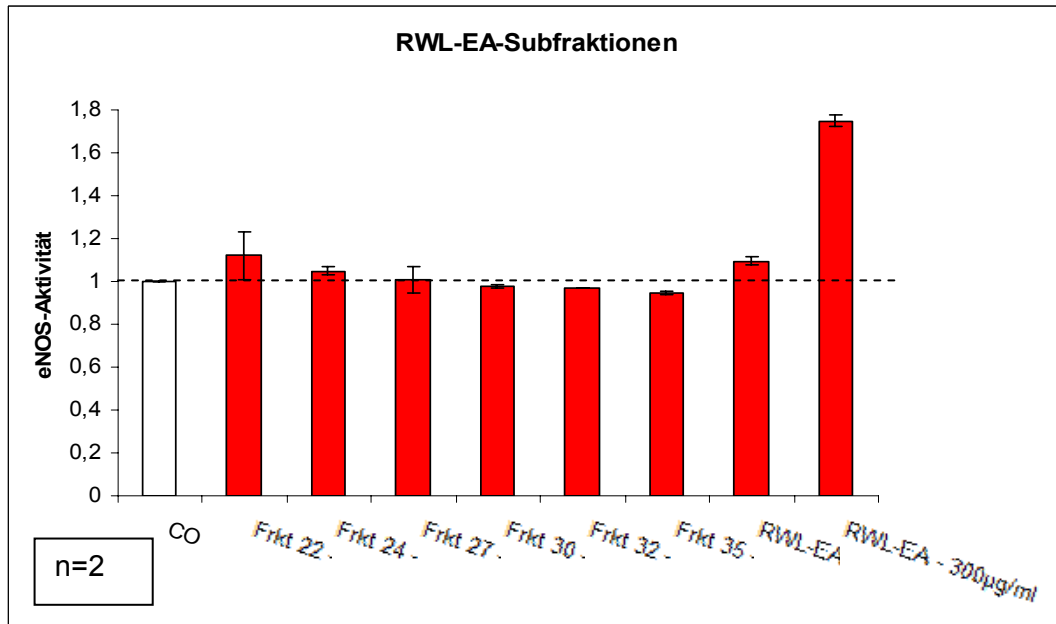


**Abb. 53: HPLC-Vergleich (Min.37-46) der RWL-EA-Subfraktionen**

### 3.2.4.3 Bioassay-Ergebnisse

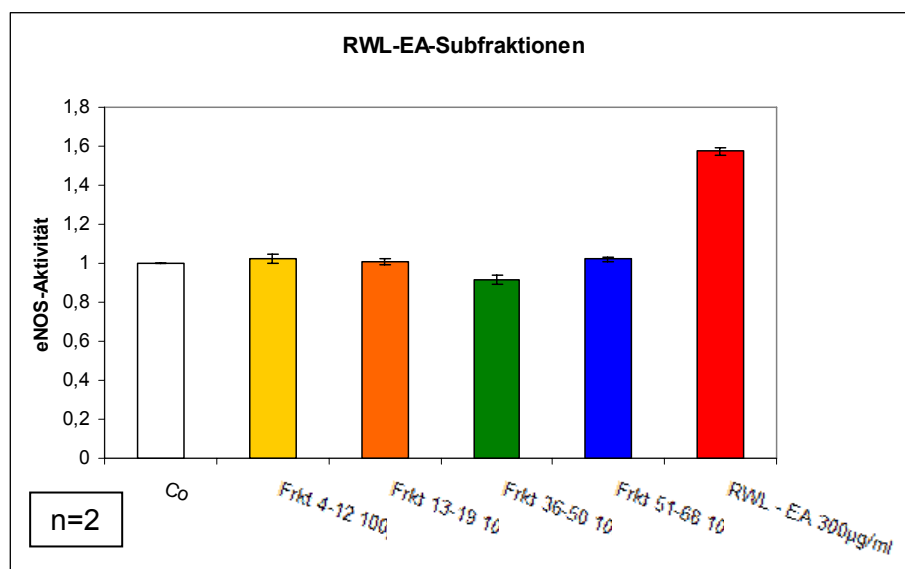
Zur Untersuchung der Wirkung der RWL-EA-Subfraktionen auf die Aktivität der eNOS wurde der ACCA (s. Kap. 2.4) durchgeführt.

Zu Beginn wurden die ausgewählten Subfraktionen 22, 24, 27, 30, 32 und 35 im Bioassay untersucht. In Abb. 54 wird deutlich, dass keine dieser Subfraktionen eine Steigerung der eNOS-Aktivität bewirkt, jedoch bewirkt die RWL-EA-Fraktion, wie bereits festgestellt wurde (s. Kap. 3.2.3.3), eine Aktivitätserhöhung. Möglicherweise sind die aktiven Substanzen in anderen Subfraktionen enthalten und um dies feststellen zu können, wurde eine größere Anzahl an Subfraktionen vereint und erneut auf ihre Wirkung untersucht (s. Abb. 55).



**Abb. 54: Bioassay-Ergebnisse bestimmter RWL-Subfraktionen**

Anhand der Abb. 55 zeigt sich, dass auch das Zusammenführen der Subfraktion 4-12, 13-19, 36-50 und 51-68 keinen positiven Effekt auf die eNOS-Aktivität bewirkt. Dieses Ergebnis ist möglicherweise auf einen Synergismus zurückzuführen, da die Gesamtheit der Subfraktionen (in Form der RWL-EA-Fraktion) bei 300µg/ml eine Steigerung der NO-Bildung bewirkt.



**Abb. 55: Bioassay-Ergebnisse der RWL-EA-Subfraktion**



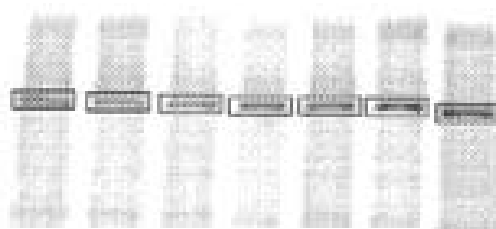
### 3.2.4.4 Western Blot

Als Abschluss dieser Arbeit wurden die RWL-EA-Subfraktionen mit Hilfe des Western Blots auf ihre Wirkung bezüglich einer gesteigerten eNOS-Proteinexpression untersucht (s. Kap. 2.5).

In Tab. 25 und Abb. 57 sind die Ergebnisse dargestellt. Der Kontrollwert ist auf 1 eingestellt und die erhaltenen Ergebnisse werden auf diesen Wert normiert. Es wird ersichtlich, dass die Subfraktionen keinen positiven Effekt auf die Proteinexpression bewirken, sondern in dieser verwendeten Konzentration hat ein Großteil der getesteten Fraktionen den Anschein, die Expression des eNOS-Enzyms zu inhibieren.

Name	eNOS	alpha-Tub	eNOS/alpha-Tub	Norm auf Co
<b>Kontrolle</b>	2584195	2536318	1,143649103	<b>1</b>
<b>Subfrkt 22 100µg</b>	2015950	3362973	0,599454709	<b>0,52</b>
<b>Subfrkt 24 100µg</b>	2016690	2874025	0,701695358	<b>0,61</b>
<b>Subfrkt 27 100µg</b>	2242162	2038622	1,099841952	<b>0,96</b>
<b>Subfrkt 30 100µg</b>	2675656	3187299	0,839474426	<b>0,73</b>
<b>Subfrkt 32 100µg</b>	2935505	4927399	0,59575143	<b>0,52</b>
<b>Subfrkt 35 100µg</b>	3938508	6593315	0,597348678	<b>0,52</b>

**Tab. 25: Western-Blot-Ergebnisse der RWL-EA-Subfraktionen in Bezug auf eine gesteigerte eNOS-Proteinexpression**



**Abb. 56: Darstellung der eNOS-Bande bei 133kDA**



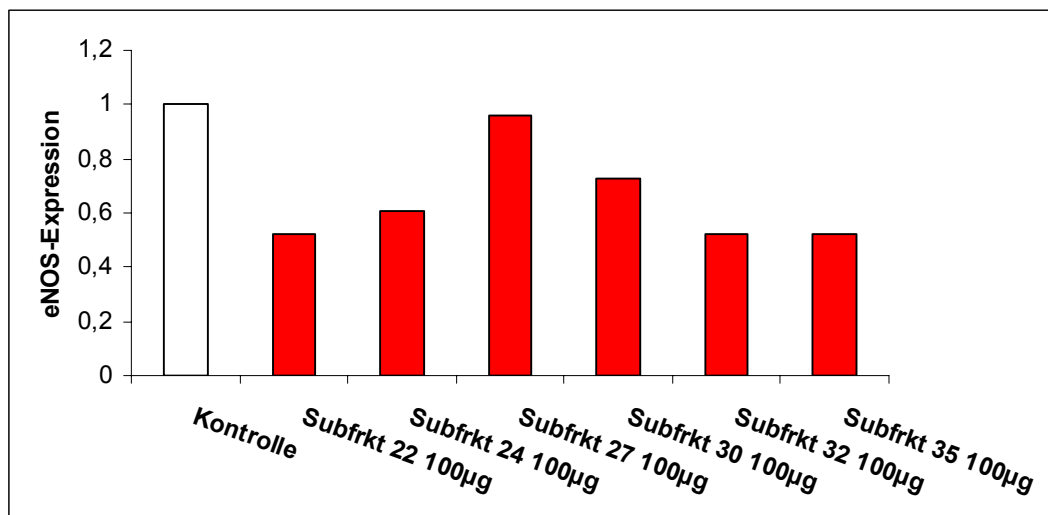


Abb. 57: Western-Blot-Ergebnisse der RWL-EA-Subfraktionen

## 4 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die MeOH-Fractionen (s. Kap. 2.2.1) der Traubenbestandteile (s. Kap. 2.1.1) und vom Rotem und Grünem Weinlaub (s. Kap. 2.1.2) einen positiven Effekt auf die endotheliale NO-Synthase d.h. eine gesteigerte NO-Bildung bewirken. Das Hauptaugenmerk wurde auf diese Extrakte gelegt und diese weiter fraktioniert und analysiert. Das Ziel war es, die wirksamen Inhaltsstoffe zu charakterisieren und mögliche Reinsubstanzen zu identifizieren.

Die Auftrennung der MeOH-Fractionen in EA- und H<sub>2</sub>O-Phasen und die darauffolgenden HPLC- und DC-Untersuchungen zeigten, dass der Hauptteil der Substanzen in den apolaren EA-Fractionen angereichert war. Bei diesen Inhaltsstoffen handelt es sich hauptsächlich um Flavonoide (s. Kap. 3.1.3.1, 3.1.3.2), wohingegen sich Fruchtsäuren, Gerbstoffe und Oligomere die polaren Fractionen angereicht haben (s. Kap. 3.1.3.1, 3.1.3.2). Der Vergleich der apolaren Fractionen der einzelnen Traubenbestandteile weist einerseits auf gemeinsame Inhaltsstoffe der SCH und ST hin, die möglicherweise auf eine nicht quantitative Trennung zurückzuführen sind, und andererseits gibt es Übereinstimmung der K und ST in ihrem Inhaltsstoffmuster (s. Abb. 16).

Im Zelltest zeigten die EA-Fractionen der SCH und der K eine Steigerung der NO-Synthese (s. Abb. 25). Hingegen konnten bei der ST-EA-Fraktion keine Ergebnisse erzielt werden, da die getestete Konzentration zum Absterben der Zellen führte. Auffallend war eine offensichtliche Aktivitätssteigerung der H<sub>2</sub>O-Fraktion der Kerne bei 600µg/ml. Dieses Ergebnis konnte nicht als positiv bewertet werden, da es zu einer starken Beeinträchtigung der Zellfunktion kam. Im Vergleich zwischen SCH-MeOH-Fraktion und SCH-EA-Fraktion konnten keine wesentlichen Unterschiede aufgezeigt werden, d.h. es wurden keine NO-hemmenden oder NO-aktivierende Substanzen abgetrennt. Bei der Steigerung der eNOS-Aktivität handelt es sich ausschließlich um eine Aktivierung des Enzyms, da man anhand der Western Blot-Ergebnisse eine erhöhte eNOS-Proteinexpression ausschließen konnte (s. Kap. 3.1.3.4).

Die SCH-MeOH-Fraktion konnte mit Hilfe der Gelchromatographie in weitere Subfraktionen aufgetrennt werden (s. Kap. 3.1.4) und es gab Hinweise auf stark angereicherte Substanzen. Die Subfraktionen 19, 21 und 24 zeigten im Chromatogramm (s. Abb. 28) markante Zonierungen, die lediglich hier sichtbar waren. Bezüglich des ACCA-Bioassays wurden Subfraktionen ausgewählt, die zum einen vermutete Reinsubstanzen enthielten, und zum anderen ein großes Spektrum an Inhaltsstoffen aufwiesen. Die untersuchten SCH-MeOH-Subfraktionen zeigten im Gegensatz zur SCH-MeOH-Fraktion keine Aktivitätssteigerung der eNOS (s. Abb. 29). Diesem Umstand zufolge müssten fortführende Untersuchungen mit allen Subfraktionen getätigt werden, aber grundsätzlich ist ein Synergismus der Inhaltsstoffe nicht von der Hand zu weisen.

Analog zu den Traubenbestandteilen wurde auch Rotes und Grünes Weinlaub untersucht. Die MeOH-Fractionen stellten sich als wirksam heraus und wurden ebenfalls in EA- und H<sub>2</sub>O-Phasen aufgetrennt (s. Kap. 3.2.2, 3.2.3). Bei diesem Fraktionierungsschritt zeigten die H<sub>2</sub>O-Fractionen eine deutlich höhere Ausbeute als die EA-Fractionen (s. Abb. 32), wohingegen die qualitative Gegenüberstellung in den HPLC-ELSD-Chromatogrammen (s. Abb. 39) deutlich machte, dass der Hauptanteil der Inhaltsstoffe in der EA-Phase angereichert ist. Unter Zuhilfenahme der DC und HPLC wird ersichtlich, dass das Rote und Grüne Weinlaub ein nahezu einheitliches Inhaltsstoffmuster aufweisen. Die EA-Fraktion des GWL enthält lediglich eine zusätzliche Zonierung an der Fließmittelfront bei der DC (s. Abb. 32) bzw. Peak (Min 55-60) bei der HPLC (s. Abb. 33), die für das enthaltene Chlorophyll charakteristisch sind. Die weiteren Analysen wurden ausschließlich mit dem RWL durchgeführt. Wiederum zeigte eine EA-Fraktion eine Aktivitätssteigerung der eNOS (s. Abb. 40), ohne eine Steigerung der eNOS-Proteinexpression zu bewirken (s. Abb. 42).

Zur Charakterisierung des komplexen Substanzengemisches der wirksamen RWL-EA-Fraktion wurde die LC-MS herangezogen. Ziel war es, die Inhaltsstoffe zu identifizieren, die möglicherweise für die Aktivitätssteigerung verantwortlich sind. Die 5 erhaltenen Hauptinhaltsstoffe ergaben im Abgleich mit der Datenbank gute Matches mit unterschiedlichen Flavonoiden (s. Abb. 44-48), nämlich Quercetin- und Kämpferol-Derivate.

Die RWL-EA-Fraktion wurde mit Hilfe der Gelchromatographie weiter fraktioniert, um eine Identifizierung der Inhaltsstoffe zu ermöglichen. Um die Trennleistung zu überprüfen, kam die Dünnschichtchromatographie zum Einsatz. Der Großteil der Inhaltsstoffe war in Subfraktionen 20-35 enthalten (s. Abb. 50 und 51). Für weitere Analysen wurden jene Subfraktionen gewählt, in denen möglichst alle sichtbaren Zonierungen vorhanden sind. Die Wahl fiel auf die Subfraktionen 22, 24, 27, 30, 32, 35. Anhand des erhaltenen HPLC-Chromatogramms (s. Abb. 52 und 53) konnte auf eine gute Trennleistung geschlossen werden und mit Hilfe der LC-MS-Ergebnisse konnte eine Zuordnung der Peaks zu den Inhaltsstoffen erzielt werden. Die Subfraktion 35 zeigt bei Minute 40-42 einen Hauptpeak, der möglicherweise auf das enthaltene Quercetin-Derivate zurückzuführen ist (s. Abb. 44). Diese Substanz ist in Subfraktion 32 ebenfalls enthalten, die weitere zwei Peaks (Minute 42,2-42,9 und 42,9-43,4) erkennen lässt (s. Abb. 47,48). Im Abgleich mit den LC-MS-Ergebnissen handelt es sich hierbei wahrscheinlich um ein Kämpferol-Derivat und ein methyliertes Quercetin. Der für dieses Kämpferol-Derivate charakteristische Peak ist in Subfraktion 27 als Hauptpeak, und in geringen Maßen in Fraktion 27 vorhanden. Die Subfraktion 30 weist zusätzlich zu diesen beiden Inhaltsstoffen, mit dominierendem methylierten Quercetin, einen Peak bei einer Retentionszeit von 41,3-42,0 auf, der für ein Kämpferol-Derivat charakteristisch ist (s. Abb. 46).

Die möglicherweise identifizierten fünf Hauptinhaltsstoffe der RWL-EA-Fractionen bzw. Subfraktionen wurden im ACCA-Bioassay auf ihre eNOS-Aktivität untersucht. Die ausgewählten Subfraktionen zeigten, im Vergleich zur RWL-EA-Fraktion, keine Steigerung der NO-Bildung (s. Abb. 54). Die Western Blot-Ergebnisse bekräftigten diesen Umstand, dass diese Subfraktionen keinen Effekt auf die NO-Bildung haben, da keine erhöhte eNOS-Proteinexpression festgestellt wurde (s. Abb. 57). Um sicherzustellen, dass sich die gegebenenfalls wirksamen Substanzen nicht in anderen Subfraktion angereichert haben, wurden die Subfraktion 4-12, 13-19, 36-50 und 51-68 zusammengeführt und erneut im Zelltest untersucht. Auch hierbei konnte eine Aktivitätssteigerung erzielt werden (s. Abb. 55).

Diese Ergebnisse lassen schlussendlich vermuten, dass die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase und die daraus resultierende gesteigerte NO-Bildung auf einen Synergismus der Inhaltsstoffe sowohl bei den Traubenbestandteilen, als auch beim Weinlaub zurückzuführen ist. Zur vollständigen Abklärung dieser Hypothese sollten jedoch in weiteren Arbeiten geeignete Konzentrationen von Fraktionen und Reinsubstanzen getestet werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die aktivitätsgeleitete Fraktionierung und Charakterisierung der Inhaltsstoffe von Traubenbestandteilen (Schalen, Kerne, Stängel und Saft) und von Rotem und Grünem Weinlaub wurde in dieser Diplomarbeit durchgeführt.

Ursprünglich erwiesen sich die polyphenolischen Inhaltsstoffe des Rotweins anhand einer Reihe von in-vivo und in-vitro Studien aufgrund ihrer Aktivitätssteigerung der endothelialen NO-Synthase und somit einer Erhöhung der NO-Bildung, als kardioprotektiv<sup>24</sup>. NO zählt zu den wichtigsten Mediatoren für ein einwandfrei funktionierendes Endothel, das neben dem vasodilatierenden Effekt auch die Thrombozytenaggregation und Adhäsion der Leukozyten hemmt, sowie einen antiproliferierenden Effekt hat. Aus diesem Grund wird dem NO eine entscheidende Rolle bei der Artherosklerose-Prävention zugeschrieben. Artherosklerose ist eine der Hauptursachen für die Entstehung von Herz-Kreislauferkrankung, die in Österreich und anderen Industrieländern zu den häufigsten Todesursachen zählt<sup>25</sup>.

Das Hauptziel dieser Diplomarbeit war die Charakterisierung und Identifizierung der wirksamen Substanzen. Die bereits durchgeführten Bioassays machten deutlich, dass der Gärungsprozess allein nicht für die Wirkung des Rotweins verantwortlich ist, sondern dass der Traubensaft selbst eine Wirkung hat<sup>26</sup>. Demzufolge wurden einerseits die Traubenbestandteile, andererseits das Rote und Grüne Weinlaub für Untersuchungen herangezogen.

Zu Beginn wurden die mittels ASE erhaltenen MeOH- und DCM-Fraktionen der Traubenbestandteile und des Weinlaubs (Rot und Grün) auf ihrer eNOS-Aktivität untersucht. Der Schwerpunkt lag bei den MeOH-Fraktionen, da diese eine Steigerung der NO-Bildung bewirkten. Im anschließenden Fraktionierungsschritt wurden die MeOH-Fraktionen in eine polare H<sub>2</sub>O- und eine apolare EA-Fraktion

---

<sup>24</sup> Leikert et al (2002)

<sup>25</sup> Räthel T.R. (2005)

<sup>26</sup> Donath O.

aufgetrennt und mit Hilfe der HPLC und DC charakterisiert und analysiert. Ziel war es, das Inhaltsstoffmuster bzw. isolierte Substanzen mit den ACCA- und Western Blot Ergebnissen in Verbindung zu bringen.

Weiters wurden die SCH-MeOH-Fraktion und die RWL-EA-Fraktion mit Hilfe der Gelchromatographie weiter fraktioniert und die erhaltenen Subfraktionen konnten mittels DC- und HPLC-Vergleiche charakterisiert werden. Im Falle der Sch-MeOH-Fraktion wurden im Anschluss jene Subfraktionen für den ACCA-Bioassay ausgewählt, die vermutete Reinsubstanzen enthielten, bzw. ein großes Spektrum an Inhaltsstoffen (hauptsächlich Flavonoide und Phenolcarbonsäuren) aufwiesen. Im Zelltest erwiesen sich jene Subfraktionen, im Gegensatz zur SCH-MeOH-Fraktion, als unwirksam.

Bezugnehmend auf die Fraktionierung der RWL-EA-Fraktion, zeigten die DC- und HPLC-Vergleiche eine gute Trennleistung. Die Subfraktionen 20-35 enthielten den Großteil der Inhaltsstoffe und wurden daher für weitere Analysen herangezogen. Mit Hilfe der LC-MS konnte eine Zuordnung der fünf Hauptpeaks zu den Inhaltsstoffen erzielt werden. Es handelt sich um Kämpferol- und Quercetin-Derivate (z.B. Glucose, Galaktose). Die identifizierten Inhaltsstoffe wurden im ACCA-Bioassay auf ihre eNOS-Aktivität bzw. Western Blot auf die eNOS-Proteinexpression untersucht, zeigten jedoch keine Steigerung der NO-Synthese.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die eNOS-Aktivität und damit die gesteigerte NO-Bildung auf einen Synergismus der Inhaltsstoffe der Traubenbestandteile und des Weinlaubs zurückzuführen sind.

## ABSTRACT

In the course of this diploma thesis an activity guided fractionation and characterisation of components of grapes' constituent parts (paring, seeds, stipe and juice) respectively red and green wine leaves was accomplished.

By executing several in-vivo and in-vitro studies of polyphenols of red wine it could be shown that due to an increasing activity of endothelial NO-synthase and therefore augmented NO-formation, polyphenols can be seen cardioprotective.

NO is one of the most important mediators for an efficient endothial function, which causes vasodilatation, antiproliferation and an inhibition of aggregation of thrombocytes and adhesion of leucocytes. For these reasons NO is said to play a decisive role in preventing artherosclerosis. Artherosclerosis is one of the leading causes of the formation of cardiovascular diseases, which are counted among the most frequent causes of death in Austria and other industrial countries.

This diploma thesis' main aim was the characterization and identification of active substances against artherosclerosis. Bioassays, which had already been realized, revealed that not only the vinification, but also grapejuice itself, are responsible for the effect of red wine. Therefore constituent parts as well as red and green wineleaves were used for analysis.

At first the eNOS-activity of MeOH and DCM-fraction of grapes' constituent parts and wine leaves (green and red) was analysed. A focus was set on MeOH fractions causing an acceleration of NO formation. In a second step, MeOH fractions were split up into polar H<sub>2</sub>O and apolar EA fractions and thereupon characterized and analysed via HPLC and TLC. The aim was to link all constituent parts as well as isolated substances with the results of ACCA and Western Blot.

Furthermore, SCH-MeOH fraction and RWL-EA-fraction were further fractionized by means of a gel chromatography. Generated subfractions were characterized via TLC and HPLC comparisons. In case of Sch-MeOH-fraktion, those subfractions were chosen for an ACCA-bioassay, which contained some main



substances and offered a wide spectrum of ingredients (mainly flavonoids and phenolcarbonic acids). In contrast to SCH-MeOH fraction, subfractions which were elected for a cell assay turned out to be inactive.

In terms of the fractionation of the RWL-EA-fraction, TLC- and HPLC-comparisons showed a satisfying separating capacity. Subfractions 20-35 contained the majority of ingredients and were therefore picked out for further analysis. By means of LC-MS the ingredients were allocated to the five main peaks, which are Kämpferol and Quercetin derivatives (for example glucoside and galactoside). By the use of an ACCA-bioassay and Western Blot, the eNOS-activity and eNOS-protein expression of identified ingredients were assayed and the enhancement of NO-synthesis could not be verified.

The results indicate that the eNOS activity and therefore the enhanced NO formation is due to a synergism of grapes' constituents and wine leaves' ingredients.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Donath O. Dissertation Universität Wien, in Vorbereitung

Hager E. Aktivitätsgeleitete Fraktionierung ausgewählter österreichischer Rotweine. Diplomarbeit Universität Wien. 2009

Leikert JF, Räthel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red Wine Polyphenols Enhance Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Subsequent Nitric Oxide Release From Endothelial Cells. *Circulation*. 2002; 106 (13): 1614 - 7.

Räthel T.R. Untersuchungen zum Einfluss von Sojaisoflavonen und Rotweinpolyphenolextrakten auf die Expression und Aktivität der endothelialen NO-Synthase. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2005

Renaud S; de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992; 339: 1523 - 6.

Lottspeich F, Engels JW. Bioanalytik. 2006

Aktores K, Föstermann U, Hofmann F, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 2005

Dirsch V M. Rotwein – Prävention mit Genuss?. *Apotheken-Magazin* 2004; 22: 136–139.

URL:[http://www.statistik.at/web\\_de/statistiken/gesundheit/todesursachen/todesursachen\\_ausgewaehlte/024439.html](http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/todesursachen/todesursachen_ausgewaehlte/024439.html), 20.06.2011

URL:[http://www.wiley-vch.de/books/sample/3527321195\\_c01.pdf](http://www.wiley-vch.de/books/sample/3527321195_c01.pdf), 12.04.2011

URL:[http://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm/2004/Schmid/AnalytischeChemie\\_Skript\\_3\\_LC.pdf](http://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/biopharm/2004/Schmid/AnalytischeChemie_Skript_3_LC.pdf), 12.04.2011

---

## 7 LEBENS LAUF



### Persönliche Daten

Name: Sandra Kastner  
Geburtsdatum: 18. März 1986  
Geburtsort: Wien  
Adresse Geusaugasse 47/21  
1030 Wien  
Email sandra\_kastner@gmx.net  
Staatsbürgerschaft: Österreich

### Ausbildung

1992-1996: Volksschule Petrusgasse, Wien  
1996-2004: GRG 3 Hagenmüllergasse, Wien  
2004: Matura  
2004-2011: Studium der Pharmazie an der Universität Wien  
03/2009 – 06/2009: Durchführung der praktischen Arbeiten für die Diplomarbeit

### Beschäftigungen

07/2002: Beamtenversicherungsanstalt (BVA)  
07/2003: Beamtenversicherungsanstalt (BVA)  
08/2004: Beamtenversicherungsanstalt (BVA)  
Seit 03/2006 Allerheiligen Apotheke

